

**BESTIMMUNG DER MOTILITÄT VON BULLENSPERMIEN
MIT HILFE DER COMPUTER-VIDEOMIKROGRAPHIE IM
VERGLEICH ZUR SUBJEKTIVEN SCHÄTZUNG**

Gabriele Stumpe
München 1989



Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

BESTIMMUNG DER MOTILITÄT VON BULLENSPERMIEN MIT HILFE DER COMPUTER-VIDEOMIKROGRAPHIE IM VERGLEICH ZUR SUBJEKTIVEN SCHÄTZUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tierärztlichen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Gabriele Stumpe
aus
Wuppertal

1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Univ.-Prof. Dr. W. Leidl
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Dr.habil. K. Osterkorn

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Vergleichbarkeit subjektiver Schätzungen	2
2.2. Vergleich von subjektiver Motilitätsschätzung und objektiven Methoden	3
2.2.1. Direkte Messung im mikroskopischen Bild	3
2.2.2. Fotogrammetrie	4
2.2.3. Spektrophotometrie	5
2.2.4. Multiple exposure photography	6
2.2.5. Computergesteuerte Bildanalyse und Videomikrographie	6
2.3. Beziehungen zwischen Motilitätsparametern und Fruchtbarkeit	8
3. UNTERSUCHTE TIERE UND METHODEN	9
3.1. Beteiligte Besamungsstationen	9
3.2. Untersuchte Bullen	9
3.3. Spermagewinnung und -verarbeitung	9
3.4. Versuchsaufbau	10
3.4.1. Vorbereitung der Proben	11
3.4.1.1. Nach der Spermagewinnung	11
3.4.1.2. Nach der Adaptionszeit	12
3.4.1.3. Nach dem Auftauen	12
3.4.2. Schätzung der Motilität im mikroskopischen Bild	12

	Seite
3.4.3. Technik der Videoaufnahmen	13
3.4.4. Computergesteuerte Videomikrographie	15
3.4.4.1. Geräte	15
3.4.4.2. Meßprinzip	16
3.4.5. Schätzung der Motilität am Videomonitor	18
3.5. Non-Return-Raten	19
3.6. Statistische Methoden	19
 4. ERGEBNISSE	 20
4.1. Mit der Bildanalyse bestimmte Motilitäts- parameter	 20
4.1.1. Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien	 20
4.1.2. Geschwindigkeit der Spermien	26
4.2. Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Schätzung und nach Computer-Videomikrographie	 31
4.3. Vergleich der Verfahren durch Beurteilung der Motilität am Videomonitor durch mehrere Untersucher und Computer-Videomikrographie	 40
4.4. Non-Return-Raten und Motilitätsparameter	46
 5. DISKUSSION	 49
6. ZUSAMMENFASSUNG	61
7. SUMMARY	63
8. LITERATURVERZEICHNIS	65

1. EINLEITUNG

Die Routineuntersuchung der Ejakulate für die künstliche Besamung umfaßt im wesentlichen die Bestimmung der Spermienkonzentration und der Motilität. Die Dichtebestimmung dient zur Berechnung der Verdünnung und erfolgt durch objektive Verfahren. Die Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) ist das entscheidende Kriterium für die Verwendbarkeit eines Ejakulates, sowohl beim Frischsamen als auch nach der Tiefgefrierkonservierung. Besondere Bedeutung kommt der Motilitätsbestimmung zu, seitdem in den Gewärtschaftsbedingungen für Bullen bei Tiefgefrier-Sperma ein Auftauergebnis von mindestens 50% vorwärtsbeweglicher Spermien festgelegt wurde. Trotz dieses hohen Stellenwertes erfolgt die Beurteilung des Anteils vorwärtsbeweglicher Samenzellen auch heute noch fast ausschließlich durch Schätzung im mikroskopischen Bild. Da inzwischen Erfahrungen mit dem Einsatz objektiver Verfahren vorliegen, sollten in diesen Untersuchungen die Ergebnisse der Motilitätsschätzung im Routinebetrieb der Besamungsstationen mit der Auswertung durch die Computer-Videomikrographie verglichen werden. Weiterhin sollte die Verwendbarkeit des Systems im praktischen Einsatz an den Besamungsstationen überprüft werden.

2. LITERATUR

2.1. Vergleichbarkeit subjektiver Schätzungen

Über die Reproduzierbarkeit subjektiv bestimmter Motilitätsparameter (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) bzw. die Unterschiede zwischen verschiedenen Untersuchern liegen nur wenige Angaben vor.

GASSNER et al. (1959) verglichen die subjektive Schätzung der Motilität von 28 Bullenejakulaten mit der Migrationsrate (aktive Wanderung der Spermien in spermienfreies Medium). Die Schätzwerte wurden in Werten von 0 bis 4 angegeben (schlecht bis sehr gut). Es zeigte sich, daß die mit sehr gut (4) beurteilten Ejakulate eine Migrationsrate von 8,4% bis 86,6% aufwiesen.

VAN DUIJN et al. (1971) filmten Spermaproben aus 40 Human-ejakulaten jeweils 40 Sek. lang. Diese Aufnahmen wurden fünf Personen unabhängig voneinander dreimal zur Beurteilung vorgelegt. Die Varianz zwischen den Schätzungen eines Untersuchers war signifikant geringer als die zwischen verschiedenen Untersuchern ($p < 0,0005$). Der Variationskoeffizient aller Untersucher bei der Schätzung einzelner Ejakulate betrug bis zu 30%.

JOUANNET et al. (1977) ließen 27 Proben von Humansperma je dreimal von 3 Untersuchern im mikroskopischen Bild schätzen. Zwei dieser Untersucher (II+III) waren gut eingearbeitet,

einer (I) unerfahren. Bei den Motilitätsschätzungen des Untersuchers I betrug die höchste Differenz bei der dreimaligen Beurteilung derselben Samenprobe 20%, bei Untersucher II sogar 35%. Die Mittelwerte aus den wiederholten Beurteilungen der 27 Samenproben unterschieden sich nur bei Untersucher II signifikant. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, daß bei der Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Samenzellen in bestimmten Fällen zwischen verschiedenen Untersuchern Abweichungen bis zu 50% auftreten können.

2.2. Vergleich von subjektiver Motilitätsschätzung und objektiven Methoden

2.2.1. Direkte Messung im mikroskopischen Bild

BAKER et al. (1957) verglichen bei Bullensperma Schätzung und Motilitätsbestimmung mit Hilfe einer sogenannten Petroff-Hausser-Kammer. Hierbei wurde im mikroskopischen Bild beobachtet, wieviel Zeit 10 Spermien benötigen, um eine bestimmte Linie zu passieren. Die Autoren kamen bei 10 Ejakulaten, die von einem Untersucher beurteilt wurden, zu dem Ergebnis, daß Ejakulate mit sehr guter Spermienmotilität häufig unterbewertet wurden.

2.2.2. Fotogrammetrie

Das in Abschnitt 2.1. beschriebene Filmmaterial wurde von VAN DUIJN et al. (1971) fotogrammetrisch (ROTHSCHILD, 1953) ausgewertet und den Motilitätsschätzungen von zwölf Untersuchern gegenübergestellt. Für die objektive Bestimmung wurden während der Projektion Fotos (Belichtungszeit 1 Sek.) vom Film angefertigt. Bewegliche Spermien bildeten sich als längliche Schatten ab und konnten ausgezählt werden. Beim Vergleich beider Verfahren wurden für die einzelnen Untersucher Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9$ bis $r = 0,36$ errechnet. Die Korrelation für alle Daten ergab einen Wert von $r = 0,76$. Unterschiede zwischen erfahrenen und unerfahrenen Untersuchern wurden nicht festgestellt. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß es nicht möglich ist, eine Standardisierung der visuellen Beurteilung durch Übung und Erfahrung zu erreichen. Außerdem wurde gezeigt, daß ein hochsignifikanter Einfluß der Bewegungsform der Spermien auf die Schätzungen aller Untersucher vorhanden war ($p < 0,0005$). Die beste Übereinstimmung wurde bei Proben mit vorwiegend geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien erzielt.

Den fotogrammetrisch ermittelten Prozentsatz beweglicher Spermien verglich MÜLLER (1968) mit den Schätzwerten von 42 Bullenejakulaten. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,82. Die geschätzten Daten, vor allem die der guten Ejakulate, waren etwas geringer als die fotogrammetrisch ermittelten.

2.2.3. Spektrophotometrie

ATHERTON (1975) untersuchte Sperma von Angus- und Hereford-Bullen nach der von TIMOURIAN und WATCHMAKER (1970) beschriebenen spektrophotometrischen Methode und verglich die erzielten Werte mit den Ergebnissen der visuellen Beurteilung der Motilität. Die Spektrophotometrie beruht auf der Messung der Lichtabsorption von Spermien in einer Flußkammer. Wird ein Fluß angelegt, orientieren sich die Spermien gegen den Strom (verminderte Lichtabsorption, erhöhte Spannung); entfällt der Fluß, kehren sie zur ungerichteten Bewegung zurück (erhöhte Lichtabsorption, verminderte Spannung). Aus den verschiedenen Spannungsstufen während der Messung wurde ein Motilitätsindex errechnet. Die "objektive" Methode ergab eine signifikante Differenz zwischen den Rassen; der Motilitätsindex war bei Angus-Bullen doppelt so hoch wie bei Hereford-Bullen. Subjektiv wurde dieser Unterschied nicht festgestellt. Eine Korrelation zwischen beiden Verfahren war nicht vorhanden. Auch WALKER et al. (1982) und LEVIN et al. (1981) konnten keine Korrelation zwischen spektrophotometrisch und durch visuelle Beurteilung erhobenen Daten feststellen.

WALL und BOONE (1973) hingegen fanden beim Vergleich einer spektrophotometrischen Methode mit dem geschätzten Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in 30 Samenproben von Hähnen eine hochsignifikante Korrelation von $r = 0,67$.

2.2.4. Multiple exposure photography

KAMIDONO et al. (1983) kamen bei der Untersuchung von 20 Spermaproben unfruchtbarer Männer zu dem Ergebnis, daß die geschätzte Motilität im Mittel um 20% unter den Werten der "Multiple exposure photography" (MAKLER, 1980a) lag. Diese Methode beruht auf der Unterbrechung des Strahlengangs im Mikroskop durch ein Stroboskop. Es werden Fotos, bei denen so die Belichtung unterbrochen wurde, aufgenommen. Bewegliche Spermien stellen sich als Kette aus mehreren Ringen dar.

2.2.5. Computergesteuerte Bildanalyse und Videomikrographie

Den von VAN DUIJN (1971) hergestellten Film verwendeten WALKER et al. (1982), um Schätzungen und Computerbildanalyse zu vergleichen. Es waren 62 Untersucher aus 30 Labors beteiligt. Aufnahmen von 18 repräsentativen Ejakulaten wurden vorgelegt. Der Vergleich der Motilitätsschätzung der Labors mit dem Prozentsatz progressiv beweglicher Zellen bei der Computerauswertung ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,92$. Der t-Test zeigte jedoch eine signifikante Differenz zwischen beiden Methoden. Im Bereich zwischen 34% und 57% vorwärtsbeweglicher Spermien (Computerauswertung) war die Differenz zur Schätzung am größten.

Beim Vergleich von Schätzung und Computerbildanalyse von gefilmten Eberspermien (8 Proben, 8 Untersucher) errechneten dieselben Autoren eine signifikante Korrelation von $r = 0,9$. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Methoden war nur bei einer Probe vorhanden.

GSCHWEND (1986) fand beim Vergleich von Schätzung und Computer-gesteuerter Videomikrographie eine signifikante Korrelation von $r = 0,48$ (Handmessung) und $r = 0,44$ (Computerauswertung). Untersucht wurden Pailletten von 40 Bullenejakulaten. Es zeigte sich, daß im Einzelfall die Ergebnisse von Schätzung und Computer-gesteuerter Videomikrographie erheblich voneinander abwichen. Zur Handmessung wurde die von KATZ und OVERSTREET (1981) beschriebene und von RIEMKE (1983) überprüfte Versuchsanordnung verwendet. Hierbei wurden Videoaufnahmen von Spermaproben am Monitor hinsichtlich Geschwindigkeit und Beweglichkeit untersucht. Für die Motilitätsmessung wurden Spermien, die entlang einer V-förmigen Linie lagen, im Standbild gekennzeichnet. Dann wurde das Band mit Hilfe einer Zeitschaltvorrichtung 0,5 Sek. lang weitergespult. Alle Spermien, die sich vom markierten Punkt entfernt hatten, galten als beweglich. Die Geschwindigkeitsmessung erfolgte mit Hilfe einer Klarsichtfolie mit Fadenkreuz und konzentrischen Kreisen, die auf den Bildschirm gelegt wurde. Durch Anlegen des Kreuz-Mittelpunktes an einen Spermienkopf und einer Bandlaufzeit von 1 Sek. konnte die Geschwindigkeit direkt abgelesen werden. Pro Ejakulat wurden 300 Zellen ausgewertet.



2.3. Beziehung zwischen Motilitätsparametern und Fruchtbarkeit

WALL et al. (1980) verglichen einen Motilitätsindex (Spektrophotometrie) mit den Befruchtungsergebnissen der 132 untersuchten Ejakulate. Die Korrelation war mit $r = 0,25$ ($p < 0,05$) niedrig; der Vergleich mit der subjektiven Schätzung ergab einen Wert von $r = 0,15$.

GSCHWEND (1986) fand eine signifikante Korrelation zwischen dem mit der Handmessung ermittelten Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen und der 60-90 Tage Non-Return-Rate der Ejakulate. Signifikant mit der NRR korreliert war auch der Prozentsatz geradlinig beweglicher Spermien bei der Computerauswertung ($r = 0,32$).

Bei der Überprüfung von drei verschiedenen Verdünnungsstufen von Bullensperma fand SCHUH (1988) nur für die Gruppe mit 10×10^6 motilen Spermien pro Besamungsdosis eine Korrelation zwischen Non-Return-Rate und prozentualer Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen von $r = 0,25$ ($p < 0,05$).

ZIEGLER (1984), der eine signifikante Beziehung zwischen NRR und der Spermienkonzentration bzw. dem Volumen der Ejakulate ermittelte, stellte fest, daß durch die Selektion der Ejakulate an den Besamungsstationen und die ausreichend hohe Anzahl intakter Spermien je Paillette die Spermaqualität auf so hohem Niveau standardisiert ist, daß das Befruchtungsergebnis weitgehend von der besamten Kuh abhängt.

3. UNTERSUCHTE TIERE UND METHODEN

3.1. Beteiligte Besamungsstationen

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern vorgenommen.

An dem Versuch nahmen 11 Besamungsstationen teil.

3.2. Untersuchte Bullen

In den Versuch wurden 127 Bullen einbezogen. Es handelte sich um Bullen folgender Rassen: Deutsches Fleckvieh (117), Braunvieh (8), Rotbunt (2). Die Auswahl der Tiere erstreckte sich auf Bullen der Jahrgänge 1976-1985 mit unterschiedlicher Spermaqualität und Befruchtungsrate. Die Tiere waren klinisch gesund und wiesen keine Besonderheiten an den Geschlechtsorganen auf. Von jedem dieser Bullen wurde zwischen September und Dezember 1986 je ein Ejakulat aus der laufenden Samenproduktion für diesen Versuch verwendet.

3.3. Spermagewinnung und -verarbeitung

Die Bullen wurden je nach Besamungsstation drei- bis viermal in 14 Tagen zur Spermagewinnung herangezogen. Diese erfolgte an allen Stationen mit der künstlichen Scheide. Als Deckpartner diente entweder ein anderer Bulle oder ein Phantom.

Die Ejakulate wurden von den Besamungsstationen dem dort üblichen Verarbeitungsprozeß für die Tiefgefrier-Konservierung unterzogen und in der KB eingesetzt.

3.4. Versuchsaufbau

Jedes Ejakulat wurde wie folgt untersucht:

1. Sofort nach der Spermagewinnung.

Verdünnung mit "Triladyl" ohne Eidotter (siehe S.11)

2. Nach der Adaptionszeit (je nach Station 3-16 Std.).

Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstation.

3. Nach dem Einfrieren und Auftauen (Lagerungszeit in flüssigem Stickstoff siehe S.12).

Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstation.

Die mikroskopischen Bilder aller Proben wurden auf Videoband aufgezeichnet und vom Fachpersonal der Besamungsstation der in der Routine üblichen mikroskopischen Motilitätsschätzung unterzogen. Die Videoaufnahmen wurden von denselben Personen am Monitor hinsichtlich der Motilität beurteilt; außerdem wurden die Aufzeichnungen mit Hilfe der computergesteuerten Bildanalyse ausgewertet. Es liegen also für die drei Proben eines jeden Ejakulates die Ergebnisse folgender Untersuchungen vor:

- Schätzung im mikroskopischen Bild
- Schätzung am Videomonitor
- Computerauswertung

Aus dem Gesamtmaterial der Videoaufnahmen wurde nach abgeschlossener Computerauswertung eine Probe TG-Sperma jeder Station ausgewählt. Diese Aufnahmen wurden erneut von jedem der Untersucher einer Motilitätsschätzung unterzogen.

3.4.1. Vorbereitung der Proben

3.4.1.1. Nach der Spermagewinnung

Jedem Ejakulat wurden sofort nach der Gewinnung 140 μ l Sperma entnommen. 100 μ l wurden zunächst mit 1 ml eines standardisierten Verdünners versetzt (250 g Triladyl-Konzentrat, Stettin Apotheke, Landshut + 750 ml Aqua dest.). Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Spermienkonzentration (Photometer LP1 mit 535 nm Filter; Dr. Lange, Berlin). 40 μ l Sperma und 960 μ l einer 4%igen Chloramin-T-Lösung wurden in einer Küvette gemischt. Entsprechend der gemessenen Extinktion konnte die Dichte an einer Eichkurve abgelesen werden. Der so ermittelte Wert war ausschlaggebend für die endgültige Verdünnung des Spermas auf ca. 50000 Spermien/ μ l. Der Verdünner wurde tropfenweise mit einer Eppendorf-Pipette zugegeben.

3.4.1.2. Nach der Adaptionszeit

Pro Ejakulat wurde eine Paillette, bzw. 500 μ l des adaptierten Spermas entnommen und auf Raumtemperatur erwärmt. Eine Station (Station 1) stellt im Unterschied zu den anderen Stationen Pellets her. Da die Ejakulate hierfür nur wenig verdünnt wurden, war die Spermienkonzentration für die Videoaufnahmen zu hoch. Aus diesem Grund wurden am Ende der Adaptionszeit 100 μ l entnommen (entsprechend dem Volumen, das für ein Pellet benötigt wurde) und bei Raumtemperatur in eine Ampulle mit Auftau-
lösung pipettiert.

3.4.1.3. Nach dem Auftauen

Von jedem Ejakulat wurde eine Paillette (im Wasserbad), bzw. ein Pellet (in Auftau-
lösung) nach der stationsüblichen Methode aufgetaut, je nach Arbeitsweise der Besamungsstation entweder am Tag der Spermagewinnung oder am folgenden Tag.

3.4.2. Schätzung der Motilität im mikroskopischen Bild

Die Motilität jeder Probe wurde von der Person, die auch üblicherweise mit der Spermauntersuchung beschäftigt war, im mikroskopischen Bild geschätzt. Die hierfür notwendigen Präparate fertigten die Untersucher selber an. Die mikroskopische Beurteilung wurde an jeder Besamungsstation in der dort

üblichen Art und Weise ausgeführt. Alle am Versuch beteiligten Stationen gaben die Motilität als Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien an. Unterschiede ergaben sich jedoch hinsichtlich der Untersuchungstechnik:

- Temperatur des Objektträgertisches (+37°C bis +40°C)
- Mikroskopische Vergrößerung (125- bis 400fach)
- Anzahl der untersuchten Präparate je Ejakulat (1-3)
- Ermittlung der Motilität aus den beurteilten Gesichtsfeldern (Durchschnittswert oder bester Eindruck).

Bedingt durch die zeitliche Nähe zum Verarbeitungsprozeß waren den Untersuchern bei der mikroskopischen Beurteilung bekannt, um welche Probenart bzw. welches Ejakulat es sich handelte.

3.4.3. Technik der Videoaufnahmen

Die Videoaufnahmen wurden mit einer auf ein Mikroskop montierten Schwarzweißkamera bei 200facher Vergrößerung im Phasenkontrast und einer Temperatur von +38°C erstellt. Die Aufzeichnung erfolgte mit einem hochauflösenden Videorekorder. Statt eines Objektträgers wurde eine auf +38°C vorgewärmte "Makler-Kammer" verwendet (Makler, 1978 und 1980b). Durch ihre festgelegte Tiefe von 10 µm gestattet sie den Spermien nur eine zweidimensionale Bewegung. Unschärfen aufgrund verschiedener Ebenen werden so vermieden. Da die Schichtdicke in der Kammer gleichmäßig ist, kann die gesamte Fläche für die Auswahl der Gesichtsfelder genutzt werden.

Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette, die eine relativ gleichmäßige Tropfengröße gewährleistet, wurde von jeder Probe zunächst ein Tropfen in die Kammer eingebracht. Von diesem Präparat wurden drei Gesichtsfelder je 10 Sek. lang aufgezeichnet. Danach wurde die Kammer mit auf $+38^{\circ}\text{C}$ temperiertem Aqua dest. gereinigt. Der gesamte Vorgang wurde dreimal durchgeführt, d.h. von jeder Probe wurden neun Gesichtsfelder aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden frühestens 15 Min. und spätestens 45 Min. nach Fertigstellung der Proben durchgeführt. Um die Auswahl der Gesichtsfelder so objektiv wie möglich zu halten, wurden als Kriterien nur das Freisein von Schmutzpartikeln und eine der Samenverdünnung entsprechende Anzahl von Spermien pro Blickfeld festgelegt.

3.4.4. Computergesteuerte Videomikrographie

3.4.4.1. Geräte

- Zählkammer nach Makler (Sefi-Medical-Instruments, Haifa, Israel)
- Mikroskop Optiphot, Objektiv plan 20 DL (Nikon)
- Heiztisch HT 100 (Minitüb, Landshut)
- Schwarzweiß-Kamera RCA 2000 (RCA)
- Schwarzweiß-Monitor TC 1910 X (RCA)
- Videorekorder AG 6200 (Panasonic)
- Beschriftungsgerät VTW 100 (FOR.A Comp. Ltd., Tokio)
- IBM-PC AT 02 mit Koprozessor Intel 80287 und 20 MB Festplatte, u.a. zur Aufnahme der Anwendersoftware
- Mikroprozessor Intel 80188 und 2 MB Bildspeicher (2 EPROM mit GRIPS = graphic imaging processing software, Fa. Dr. Grude, Brunner Medizintechnik, München, Version Februar 1987)
- Drucker Epson FX 85

3.4.4.2. Meßprinzip

Videoaufnahmen von Spermaproben werden durch den Mikroprozessor in Digitalbilder umgewandelt. Diese bestehen aus 512 Bildzeilen mit je 512 Bildpunkten (Pixel). Die Auswertung erfolgt durch Abtasten der Pixel. Bei der verwendeten Version (Februar 87) wird jeder Bildpunkt in jeder zweiten Zeile erfaßt (Halbbildverfahren). Da die Spermienköpfe sich dunkel vor hellem Hintergrund abbilden, können sie durch Erkennung des veränderten Grauwertes erfaßt werden. Als Grauwertstufen werden die Helligkeitsabstufungen zwischen weiß und schwarz bezeichnet. Es stehen 255 Stufen zur Verfügung (0 = weiß, 255 = schwarz). Der Grauwert, von dem ab ein Pixel als einem Spermienkopf zugehörig registriert werden soll, wird vor Beginn der Messung eingespeichert. Weiterhin wird festgelegt, welche minimale und maximale Größe ein Objekt haben darf, um als Spermienkopf gezählt zu werden.

Zur Auswertung wurden je Gesichtsfeld 8 Bilder im Abstand von 40 mSek. eingezogen und digitalisiert. Der Bildeinzug wird durch das Starten des Meßvorgangs eingeleitet, nachdem das Videoband an einer beliebigen Stelle der entsprechenden Aufnahme gestoppt wurde. Spermien, die über weniger als 4 Bilder verfolgt werden konnten, wurden nicht in die Analyse einbezogen. Ebenso wurden Spermien, deren Bahnen sich überschnitten, durch Vorgabe eines "Mindestkopfabstandes" eliminiert.

Für die Ermittlung der Spermienbahn wird die Position des Kopfschwerpunktes gespeichert. Der Weg, den das einzelne Spermium zurücklegt, ergibt sich aus der Summe der Strecken, die der Schwerpunkt des Spermienkopfes von Bild zu Bild zurückgelegt hat. Die Geschwindigkeit der erfaßten Spermien ergibt sich aus der tatsächlich zurückgelegten Strecke (Summe der Vektoren = V) oder aus der Position des Schwerpunktes beim ersten und beim letzten Bild (geradlinige Verbindung zwischen Anfangs- und Endpunkt = S). Die gemessene Geschwindigkeit ist ausschlaggebend für die Einteilung der Spermien in unbewegliche, ortsbewegliche und vorwärtsbewegliche. Bei dieser Auswertung von Bullenspermien wurden Zellen, die sich mit weniger als 10 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ bewegten, zu den unbeweglichen gezählt, solche mit einer Geschwindigkeit von 10-30 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ zu den ortsbeweglichen. Als vorwärtsbeweglich galt ein Spermium erst dann, wenn es mehr als 30 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ zurücklegte. Die Unterteilung der Vorwärtsbewegung in geradlinige, nicht geradlinige und unphysiologische Bewegungsformen ist durch den Quotienten aus direktem und tatsächlichem Weg ($S:V$) festgelegt. Ist der Index ($I\% = S:V \times 100$) größer als 90, wird die Spermienbewegung als geradlinig bezeichnet, zwischen 90 und 80 als nicht geradlinig und unter 80 als unphysiologisch.

3.4.5. Schätzung der Motilität am Videomonitor

Alle Videoaufnahmen, d.h. 9 Gesichtsfelder je Probe, wurden an jeder Station von dem Untersucher, der auch die mikroskopische Schätzung vorgenommen hatte, hinsichtlich der Motilität beurteilt. Diese Untersuchungen bezogen sich zunächst nur auf die Aufnahmen, die an der betreffenden Station aufgezeichnet worden waren. Durch die codierte Kennzeichnung war in diesem Versuchsabschnitt nicht bekannt, um welche Probenart bzw. um welches Ejakulat es sich handelte. Um die Schätzwerte mit denen der mikroskopischen Untersuchung vergleichen zu können, wurde aus den Einzelergebnissen für die neun Gesichtsfelder je Probe der Mittelwert berechnet.

Eine weitere Motilitätsschätzung am Videomonitor erfolgte nach abgeschlossener Computerauswertung aller aufgezeichneten Proben. Hierzu wurde je eine Probe TG-Sperma aus jeder der beteiligten Besamungsstationen ausgewählt. Es wurden jeweils 9 Gesichtsfelder der 11 ausgewählten Proben an jeder der 11 Besamungsstationen beurteilt. In diesem Versuchsabschnitt war den Untersuchern bekannt, daß es sich ausschließlich um Aufnahmen von TG-Sperma handelte. Es wurde jedoch nicht mitgeteilt, von welcher Station bzw. von welchem Bullen das entsprechende Ejakulat stammte.

3.5. Non-Return-Raten

Tiefgefrier-konserviertes Sperma der in den Versuch einbezogenen Ejakulate wurde an einigen Besamungsstationen gesondert an die Besamungsaußenstellen ausgegeben, um die Non-Return-Raten (60-90 Tage) des einzelnen Ejakulates zu ermitteln. Es sollte so überprüft werden, ob zwischen den Motilitätsparametern der untersuchten Ejakulate und dem erzielten Befruchtungsergebnis ein Zusammenhang bestand. Insgesamt 73 Ejakulate wurden zwischen September 1986 und Juni 1987 bei 10862 Erstbesamungen eingesetzt (min. 43, max. 321 pro Ejakulat).

3.6. Statistische Methoden

Für den Vergleich der Schätzwerte mit den "Computer-Werten" wurde jeweils das Mittel aus den neun untersuchten Gesichtsfeldern jeder Probe herangezogen. Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse verschiedener Motilitätsuntersuchungen anhand derselben Gesichtsfelder (siehe Abschnitt 4.3.) gingen die Einzelergebnisse in die statistische Auswertung ein. Auf eine Transformation der Prozentzahlen wurde verzichtet, weil im Datenmaterial Extremwerte (nahe 0% bzw. nahe 100%) nicht auftraten. Neben der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung wurden folgende Verfahren aus dem Statistikprogrammssystem für die Sozialwissenschaften verwendet: Berechnung von Korrelation und Regression, t-Test, Varianzanalyse, Scheffé-Test (SCHUBÖ und UEHLINGER, 1986; NORUSIS, 1986).

4. ERGEBNISSE

4.1. Mit der Bildanalyse bestimmte Motilitätsparameter

Es konnten insgesamt 127 Ejakulate ausgewertet werden. Von jedem Ejakulat wurden während des Verarbeitungsprozesses drei Proben (verdünnt, adaptiert, aufgetaut) aufgezeichnet. Neun Gesichtsfelder jeder Probe wurden der Bildanalyse unterzogen, wobei im Durchschnitt der Bahnverlauf von 618 Zellen überprüft wurde. Aus den untersuchten Ejakulaten der einzelnen Besamungsstationen wurden die Mittelwerte für jede Verarbeitungsstufe getrennt berechnet (Abb.1 und 2).

4.1.1. Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien

Bei der Computeranalyse der Motilität wird der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien aufgrund der Bewegungsformen in linear, nicht linear und unphysiologisch vorwärtsbewegliche Zellen unterteilt. Wegen des hohen Anteils linearer Bewegungsformen bei Bullensperma (x aus allen untersuchten Proben = 86,7% der vorwärtsbeweglichen Spermien) wurde auf die getrennte Darstellung anderer Formen verzichtet. Der in den Tabellen dargestellte Prozentsatz linear vorwärtsbeweglicher Spermien bezieht sich auf alle ausgewerteten Spermien.

Tab.1: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien nach Verdünnung (mit Triladyl ohne Eidotter), $\bar{x} \pm s$ aus n Ejakulaten je Station

Station	n	vorwärtsbewegl.	linear vorwärtsbewegl.
1	10	66,9 $\pm$ 14,59	62,9 $\pm$ 14,36
2	12	75,2 $\pm$ 12,91	68,2 $\pm$ 12,71
3	11	61,6 $\pm$ 15,92	56,3 $\pm$ 15,91
4	13	68,3 $\pm$ 8,11	62,7 $\pm$ 7,64
5	8	67,0 $\pm$ 4,06	59,0 $\pm$ 5,11
6	24	72,2 $\pm$ 11,54	64,8 $\pm$ 11,68
7	10	71,0 $\pm$ 13,09	64,1 $\pm$ 13,04
8	8	76,7 $\pm$ 8,56	69,0 $\pm$ 9,01
9	10	76,9 $\pm$ 9,96	69,1 $\pm$ 10,25
10	12	78,2 $\pm$ 7,85	70,1 $\pm$ 8,41
11	9	76,8 $\pm$ 11,76	68,5 $\pm$ 11,31
gesamt	127	71,9 $\pm$ 11,96	64,9 $\pm$ 11,64

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien lag bei den verdünnten Proben im Durchschnitt bei 71,9%. Den niedrigsten Mittelwert, der aus den Proben einer Station errechnet wurde, wies mit 61,6% Station 3 auf, den höchsten Wert mit 78,2% Station 10. Bei diesen Stationen fand sich auch der kleinste (56,3%) bzw. größte Anteil (70,1%) linear vorwärtsbeweglicher Spermien (Tab.1). Die Korrelation zwischen beiden Parametern war mit $r = 0,98$ signifikant ($p < 0,01$).

Tab.2: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien nach Adaption (Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstationen), $\bar{x} \pm s$ aus n Ejakulaten je Station

Station	n	vorwärtsbewegl.	linear vorwärtsbewegl.
1	10	70,8 $\pm$ 18,64	62,7 $\pm$ 19,04
2	12	54,1 $\pm$ 10,71	35,9 $\pm$ 9,14
3	11	69,5 $\pm$ 10,71	60,1 $\pm$ 10,20
4	13	70,8 $\pm$ 9,89	52,5 $\pm$ 11,29
5	8	69,9 $\pm$ 6,82	61,5 $\pm$ 6,47
6	24	57,9 $\pm$ 10,49	44,1 $\pm$ 10,60
7	10	76,8 $\pm$ 9,51	67,8 $\pm$ 9,43
8	8	79,6 $\pm$ 2,30	66,9 $\pm$ 3,04
9	10	67,1 $\pm$ 9,73	58,7 $\pm$ 8,29
10	12	82,0 $\pm$ 5,58	72,4 $\pm$ 6,01
11	9	79,8 $\pm$ 5,52	70,5 $\pm$ 5,04
gesamt	127	69,0 $\pm$ 13,25	57,1 $\pm$ 15,01

Der Rückgang der Motilität während der Adaptionszeit im Vergleich zum frisch verdünnten Samen auf durchschnittlich 69,0% war nicht signifikant (Scheffé-Test). Die ermittelten Werte lagen in diesem Untersuchungsabschnitt zwischen 54,1% (Station 2) und 82,0% (Station 10) vorwärtsbeweglicher Spermien (Tab.2). Die Korrelation mit den linear vorwärtsbeweglichen Samenzellen (Schwankungsbreite 35,9% bei Station 2 bis 72,4% bei Station 10) war signifikant ($r = 0,94$; $p < 0,01$).

Tab.3: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien **nach Auftauen** (Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstationen), $\bar{X} \pm s$ aus n Ejakulaten je Station

Station	n	vorwärtsbewegl.	linear vorwärtsbewegl.
1	10	50,5 $\pm$ 15,53	44,5 $\pm$ 15,19
2	12	47,9 $\pm$ 12,35	36,0 $\pm$ 10,20
3	11	40,7 $\pm$ 12,68	35,9 $\pm$ 11,41
4	13	57,6 $\pm$ 9,05	49,4 $\pm$ 8,43
5	8	37,0 $\pm$ 8,80	32,1 $\pm$ 7,96
6	24	46,5 $\pm$ 11,88	38,6 $\pm$ 10,17
7	10	51,2 $\pm$ 10,70	46,4 $\pm$ 10,82
8	8	58,3 $\pm$ 7,89	53,2 $\pm$ 7,17
9	10	40,1 $\pm$ 12,22	35,2 $\pm$ 11,27
10	12	59,7 $\pm$ 11,68	54,8 $\pm$ 11,03
11	9	61,3 $\pm$ 9,97	55,6 $\pm$ 9,13
gesamt	127	49,9 $\pm$ 13,38	43,3 $\pm$ 12,76

Die Proben der Station 5 zeigten nach dem Auftauen mit einem Mittelwert von 37,0% vorwärtsbeweglicher und 32,1% linear vorwärtsbeweglicher Samenzellen die niedrigste Motilität, die der Station 11 mit 61,3% bzw. 55,6% die höchste (Tab.3). Auch bei dieser Verarbeitungsstufe bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil der vorwärtsbeweglichen und der linear vorwärtsbeweglichen Spermien ($r = 0,98$; $p < 0,01$).

Zwischen den verdünnten und den adaptierten Proben einerseits und den aufgetauten Proben mit einem mittleren Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien von 49,9% andererseits bestanden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Motilität ($p < 0,01$; Scheffé-Test).

Eine Zusammenfassung der Mittelwerte aus den Anteilen vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien in den drei Verarbeitungsstufen bei allen am Versuch beteiligten Besamungsstationen zeigt die Tabelle 4.

Tab.4: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien ($\bar{X} \pm s$ aus 127 Ejakulaten in drei Verarbeitungsstufen) und Korrelationskoeffizient (r) aus beiden Parametern.

Verarbeitungs- stufe	vorwärts- beweglich %	linear vor- wärtsbeweglich %	r
verdünnt	71,9 $\pm$ 11,96	64,9 $\pm$ 11,64	0,98
adaptiert	69,0 $\pm$ 13,25	57,1 $\pm$ 15,01	0,94
aufgetaut	49,9 $\pm$ 13,38	43,3 $\pm$ 12,76	0,98

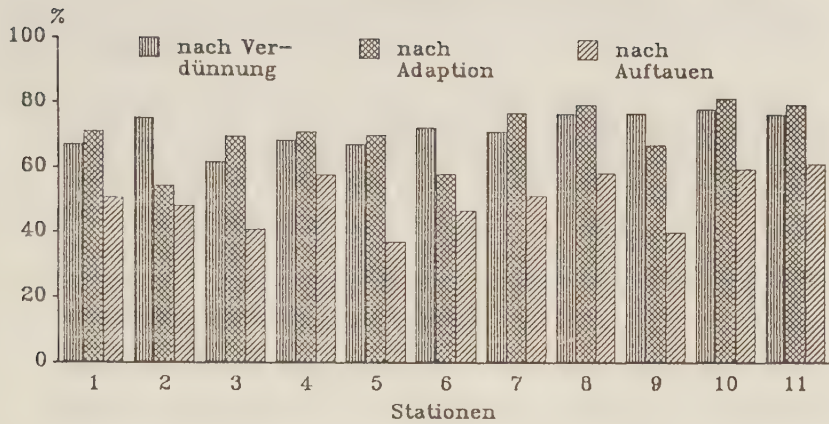


Abb.1: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, Mittelwerte aus allen untersuchten Ejakulaten je Station (Computerauswertung)

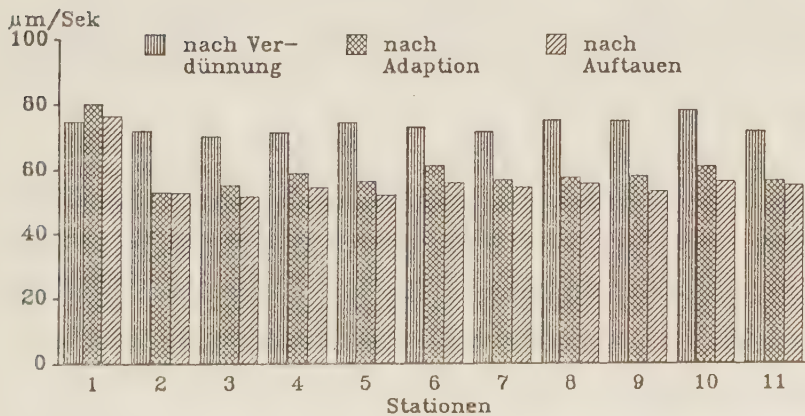


Abb.2: Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien, Mittelwerte aus allen untersuchten Ejakulaten je Station (Computerauswertung)

4.1.2. Geschwindigkeit der Spermien

Die Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien in den verdünnten Proben aller Stationen lag bei 73,2 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Tab.5). Während der Adaptionszeit sank dieser Wert auf 59,4 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ ab (Tab.6). Nach dem Auftauen der Samenproben wurde eine mittlere Geschwindigkeit von 55,8 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ gemessen (Tab.7). Die durchschnittliche Geschwindigkeit der linear vorwärtsbeweglichen Spermien zeigte nur geringfügige Abweichungen gegenüber der aller vorwärtsbeweglichen Samenzellen. Die Korrelation zwischen beiden Parametern war für alle drei Verarbeitungsstufen signifikant ($r = 0,99; 0,98; 0,99; p < 0,01$).

Der Anteil der Spermien, die sich mit mehr als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ vorwärtsbewegten, lag bei den verdünnten Proben im Mittel bei 38,5%, nach der Adaptionszeit bei 19,3% und nach dem Auftauen bei 10,4% (Tab.8).

Im Hinblick auf die Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Samenzellen und den Prozentsatz von Spermien, die sich schneller als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ bewegten, unterschieden sich die drei untersuchten Verarbeitungsstufen signifikant (Scheffé-Test; $p < 0,01$).

Tab.5: Durchschnittsgeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) der vorwärtsbeweglichen und der linear vorwärtsbeweglichen Spermien nach Verdünnung mit Triladyl ohne Eidotter, ($\bar{x} \pm s$; n = Anzahl der Ejakulate)

Station	n	vorwärtsbewegl.	linear vorwärtsbewegl.
1	10	74,5 $\pm$ 9,18	75,1 $\pm$ 9,67
2	12	71,8 $\pm$ 5,29	72,0 $\pm$ 5,34
3	11	70,2 $\pm$ 5,82	70,7 $\pm$ 6,29
4	13	71,4 $\pm$ 8,40	71,5 $\pm$ 8,72
5	8	74,3 $\pm$ 6,90	74,3 $\pm$ 7,17
6	24	72,8 $\pm$ 6,23	72,9 $\pm$ 6,34
7	10	71,5 $\pm$ 8,65	71,9 $\pm$ 8,89
8	8	75,1 $\pm$ 6,54	74,9 $\pm$ 6,53
9	10	74,9 $\pm$ 6,28	74,9 $\pm$ 7,10
10	12	78,1 $\pm$ 9,44	77,9 $\pm$ 9,48
11	9	71,6 $\pm$ 7,06	71,9 $\pm$ 7,65
gesamt	127	73,2 $\pm$ 7,34	73,3 $\pm$ 7,55

Die höchste Durchschnittsgeschwindigkeit vorwärtsbeweglicher Spermien konnte mit 78,1 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ in den verdünnten Ejakulaten der Station 10 gemessen werden. Den niedrigsten Wert zeigten die Proben der Station 3 mit 70,2 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Tab.5).

Tab.6: Durchschnittsgeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) der vorwärtsbeweglichen und der linear vorwärtsbeweglichen Spermien nach Adaption, Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstationen; $\bar{X} \pm s$, n = Anzahl der Ejakulate

Station	n	vorwärtsbewegl.	linear vorwärtsbewegl.
1	10	79,9 $\pm$ 3,89	80,0 $\pm$ 4,52
2	12	52,6 $\pm$ 4,09	47,8 $\pm$ 2,89
3	11	54,8 $\pm$ 2,53	54,0 $\pm$ 2,60
4	13	58,9 $\pm$ 5,19	55,5 $\pm$ 4,42
5	8	55,9 $\pm$ 6,76	55,7 $\pm$ 6,61
6	24	61,2 $\pm$ 5,07	59,0 $\pm$ 4,45
7	10	56,3 $\pm$ 6,03	55,9 $\pm$ 6,39
8	8	57,1 $\pm$ 4,50	55,8 $\pm$ 4,32
9	10	57,5 $\pm$ 5,32	57,2 $\pm$ 5,43
10	12	60,8 $\pm$ 6,95	60,3 $\pm$ 7,25
11	9	56,3 $\pm$ 7,63	56,0 $\pm$ 7,71
gesamt	127	59,4 $\pm$ 8,37	57,9 $\pm$ 8,80

Nach der Adaptionszeit wiesen die Proben der Station 1 eine mittlere Spermengeschwindigkeit von 79,9 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ auf. Die Proben der übrigen Stationen zeigten eine um etwa 15 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ geringere Durchschnittsgeschwindigkeit im Vergleich zum frisch verdünnten Sperma (Tab.6). Der höchste Wert lag bei 61,2 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Station 6), der niedrigste bei 52,6 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Station 2).

Tab.7: Durchschnittsgeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sek.}$) der vorwärtsbeweglichen und der linear vorwärtsbeweglichen Spermien nach Auftauen, Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstationen; $\bar{X} \pm s$, n = Anzahl der Ejakulate

Station	n	vorwärtsbewegl.	linear vorwärtsbewegl.
1	10	$76,2 \pm 5,05$	$76,8 \pm 5,87$
2	12	$52,5 \pm 2,70$	$49,7 \pm 2,72$
3	11	$51,2 \pm 3,17$	$50,9 \pm 3,64$
4	13	$54,0 \pm 5,45$	$53,1 \pm 5,58$
5	8	$51,8 \pm 4,37$	$51,1 \pm 4,61$
6	24	$55,4 \pm 3,46$	$54,5 \pm 3,55$
7	10	$54,0 \pm 3,92$	$53,9 \pm 3,88$
8	8	$55,2 \pm 4,73$	$55,2 \pm 5,03$
9	10	$53,0 \pm 3,36$	$52,7 \pm 4,03$
10	12	$56,1 \pm 7,11$	$56,2 \pm 7,23$
11	9	$54,9 \pm 6,11$	$54,9 \pm 6,34$
gesamt	127	$55,8 \pm 7,59$	$55,2 \pm 8,09$

Bei den Stationen 2 bis 11 war nach dem Tiefgefrieren und Auftauen die Spermengeschwindigkeit mit Werten zwischen $51,2 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Station 3) und $56,1 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ (Station 10) um ca. $4 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ niedriger als am Ende der Adaptionszeit. Eine Ausnahme bildete auch hier die Station 1 mit einer durchschnittlichen Spermengeschwindigkeit von $76,2 \mu\text{m}/\text{Sek.}$ nach dem Auftauen der Pellets in Auftaulösung (Tab.7).

Tab.8: Prozentsatz der Spermien, die sich schneller als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ vorwärtsbewegen; $\bar{X} \pm s$, n = Anzahl der Ejakulate

Station	n	verdünnt	adaptiert	aufgetaut
1	10	36,7 $\pm$ 12,93	49,8 $\pm$ 17,38	31,2 $\pm$ 12,14
2	12	37,7 $\pm$ 11,63	9,8 $\pm$ 4,17	7,0 $\pm$ 2,83
3	11	29,2 $\pm$ 9,78	12,8 $\pm$ 3,37	5,0 $\pm$ 2,25
4	13	34,0 $\pm$ 12,69	18,8 $\pm$ 8,10	10,3 $\pm$ 6,20
5	8	38,0 $\pm$ 10,87	14,8 $\pm$ 8,63	5,0 $\pm$ 2,70
6	24	38,3 $\pm$ 10,62	17,7 $\pm$ 5,92	9,1 $\pm$ 4,23
7	10	35,3 $\pm$ 13,39	16,0 $\pm$ 9,73	8,3 $\pm$ 4,65
8	8	44,3 $\pm$ 10,95	18,0 $\pm$ 6,57	11,3 $\pm$ 5,05
9	10	43,5 $\pm$ 10,13	14,8 $\pm$ 7,15	5,2 $\pm$ 2,03
10	12	48,7 $\pm$ 14,64	25,3 $\pm$ 13,36	12,9 $\pm$ 10,06
11	9	39,0 $\pm$ 13,58	17,3 $\pm$ 14,48	10,3 $\pm$ 7,22
gesamt	127	38,5 $\pm$ 12,48	19,3 $\pm$ 13,30	10,4 $\pm$ 8,82

Der Anteil von Spermien, die sich mit mehr als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ vorwärtsbewegten, lag bei den verdünnten Proben zwischen 29,2% und 48,7%. Die Ejakulate der Station 1 wiesen verdünnt 36,7% "schnelle" Spermien auf, adaptiert 49,8% und aufgetaut 31,2%. Bei den übrigen Stationen konnten nach der Adaptionszeit Werte von 9,8% (Station 2) bis 25,3% (Station 10) gemessen werden; nach dem Auftauen waren noch 5,0% (Stationen 2, 5, 9) bis 12,9% (Station 10) vorhanden (Tab.8).

4.2. Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Schätzung und nach Computer-Videomikrographie

Bei der Untersuchung von 381 Proben wurden Computerauswertung, Schätzung im mikroskopischen Bild und Schätzung am Videomonitor verglichen. Es wurde jeweils der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien ermittelt. Die Bestimmung der Motilität mit den drei verwendeten Methoden ergab insgesamt folgende Mittelwerte: Computerauswertung 63%, Schätzung im mikroskopischen Bild 63%, Schätzung am Videomonitor 61% vorwärtsbewegliche Spermien. Insgesamt bestand zwischen den Ergebnissen der Computerauswertung und den Schätzungen am Monitor, ebenso wie zwischen den Schätzungen im mikroskopischen Bild und am Videomonitor, ein signifikanter Unterschied (t-Test; $p < 0,05$).

Bei den Schätzungen am Videomonitor lagen 43% der Ergebnisse über den durch Computerauswertung ermittelten Werten; hierbei waren 13% der Werte um mehr als 10% höher als die objektiv erhobenen Daten. Die größte Differenz betrug 34%. Unter den Computerwerten lagen 57% der Schätzungen, 23% um mehr als 10%. Die höchste Abweichung nach unten betrug 32%. Die Korrelation zwischen Computerauswertung und Schätzung am Videomonitor war signifikant ($r = 0,72$; $p < 0,01$; Abb.3).

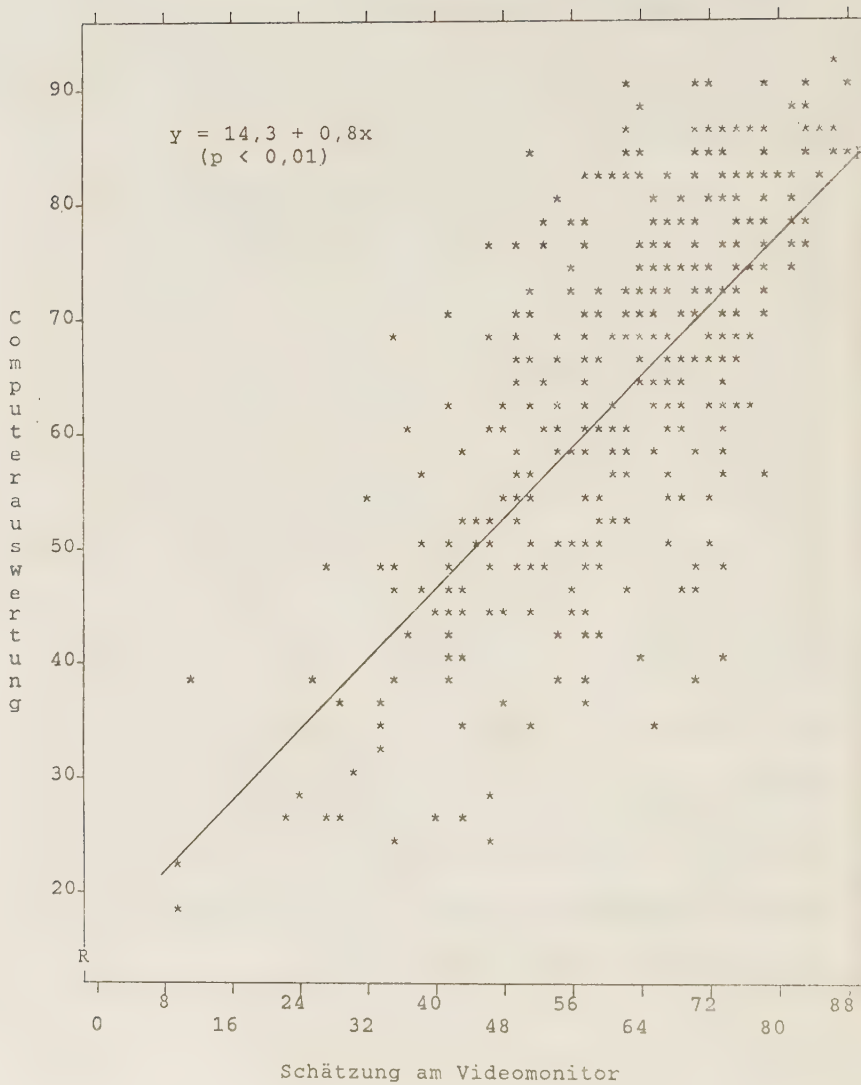


Abb.3: Beziehung zwischen Computerauswertung und Schätzung am Videomonitor bei der Auswertung von 381 Proben;
y- und x-Achse: Prozentsatz vorwärtsbewegliche Spermien

Die Korrelation zwischen Computerauswertung und Schätzung im mikroskopischen Bild war ebenfalls signifikant, wenn auch mit einem bedeutend niedrigeren Korrelationskoeffizienten ($r = 0,54$; $p < 0,01$). Auch bei dem Vergleich der Beurteilung des Anteils vorwärtsbeweglicher Samenzellen im mikroskopischen Bild mit den Ergebnissen der Bildanalyse stellte sich heraus, daß im Durchschnitt die Untersucher gleich oft höhere bzw. niedrigere Werte ermittelten. In einem Bereich von $\pm 10\%$ zum jeweiligen "objektiv" bestimmten Wert lagen insgesamt 58% der Schätzwerte. Die größte Differenz nach oben betrug 39%, nach unten 44%. Darüber hinaus traten jedoch noch zwei Wertepaare mit einer größeren Differenz auf (63% und 71%; Abb.4).

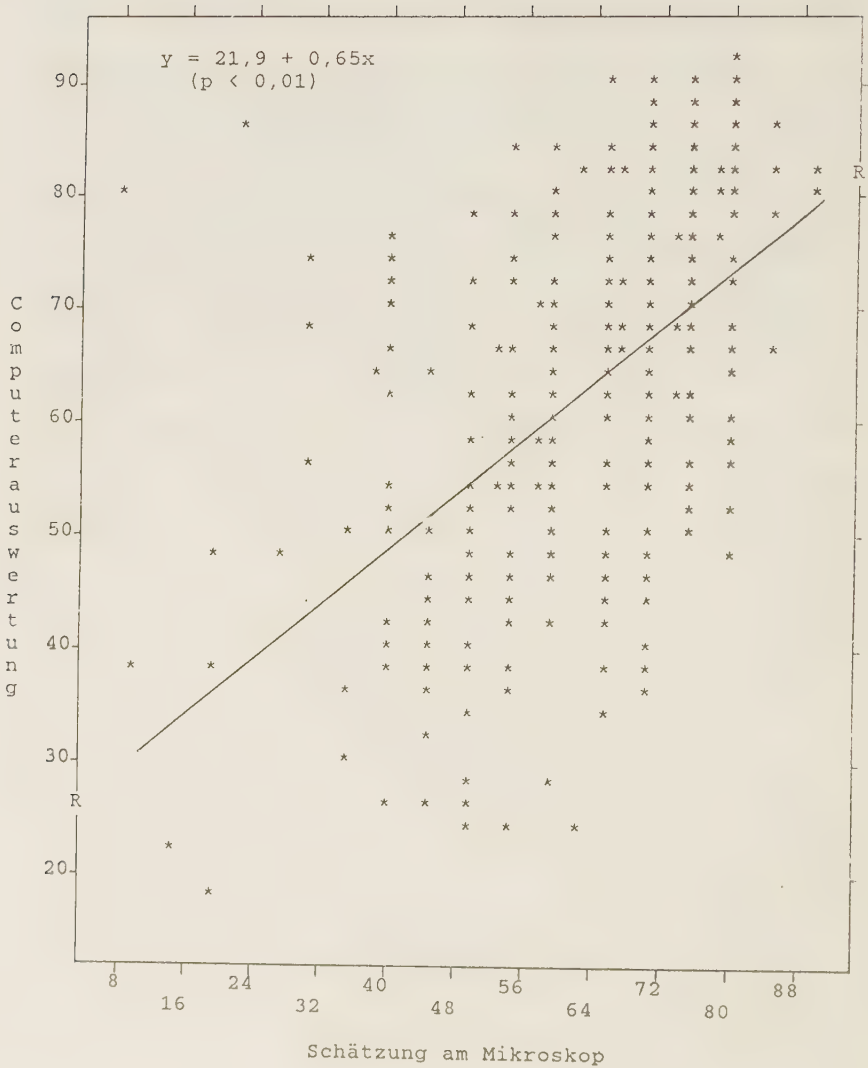


Abb.4: Beziehung zwischen Computerauswertung und Schätzung im mikroskopischen Bild bei der Auswertung von 381 Proben; y- und x-Achse: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien

Tab.9: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nach Verdünnung mit Triladyl ohne Eidotter; $\bar{X} \pm s$, n = Anzahl der Ejakulate

Station	n	Computer- auswertung	Schätzung Mikroskop	Schätzung Monitor
1	10	67 $\pm$ 14,6	64 $\pm$ 10,8	68 $\pm$ 17,2
2	12	75 $\pm$ 12,9	76 $\pm$ 4,2	73 $\pm$ 11,8
3	11	62 $\pm$ 15,9	54 $\pm$ 23,4	52 $\pm$ 18,2
4	13	68 $\pm$ 8,1	65 $\pm$ 13,4	71 $\pm$ 8,0
5	8	67 $\pm$ 4,1	68 $\pm$ 2,2	67 $\pm$ 3,2
6	24	72 $\pm$ 11,5	72 $\pm$ 5,5	76 $\pm$ 4,7
7	10	71 $\pm$ 13,1	32 $\pm$ 12,4	67 $\pm$ 11,6
8	8	77 $\pm$ 8,6	69 $\pm$ 7,3	77 $\pm$ 4,0
9	10	77 $\pm$ 10,0	76 $\pm$ 9,1	57 $\pm$ 13,0
10	12	78 $\pm$ 7,9	71 $\pm$ 6,4	74 $\pm$ 7,2
11	9	77 $\pm$ 11,8	64 $\pm$ 4,9	62 $\pm$ 7,2
gesamt	127	72 $\pm$ 12,0	66 $\pm$ 15,3	68 $\pm$ 12,6

Bei der Untersuchung der verdünnten Proben (Tab.9; Abb.5) lag der Mittelwert der Computerauswertung mit 72% vorwärtsbeweglichen Spermien signifikant über den Ergebnissen von Schätzung im mikroskopischen Bild (66%) und am Monitor (68%). Auch diese beiden Verfahren unterschieden sich signifikant (t-Test; $p < 0,05$). Die Korrelationskoeffizienten betrugen $r = 0,44$ (CVM/Mikroskop) und $r = 0,64$ (CVM/Monitor); beide Werte waren signifikant ($p < 0,01$).

Tab.10: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nach Adaption (Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstationen); $\bar{x} \pm s$, n = Anzahl der Ejakulate

Station	n	Computer- auswertung	Schätzung Mikroskop	Schätzung Monitor
1	10	71 $\pm$ 18,6	67 $\pm$ 10,9	64 $\pm$ 17,7
2	12	54 $\pm$ 10,7	71 $\pm$ 5,7	57 $\pm$ 12,7
3	11	69 $\pm$ 10,7	65 $\pm$ 11,7	61 $\pm$ 9,3
4	13	71 $\pm$ 9,9	66 $\pm$ 11,0	64 $\pm$ 13,8
5	8	70 $\pm$ 6,8	69 $\pm$ 3,2	64 $\pm$ 2,5
6	24	57 $\pm$ 10,5	72 $\pm$ 4,4	74 $\pm$ 3,6
7	10	77 $\pm$ 9,5	71 $\pm$ 10,8	70 $\pm$ 11,2
8	8	80 $\pm$ 2,3	74 $\pm$ 7,8	78 $\pm$ 1,9
9	10	67 $\pm$ 9,7	78 $\pm$ 6,3	53 $\pm$ 9,3
10	12	82 $\pm$ 5,6	72 $\pm$ 5,8	73 $\pm$ 3,6
11	9	80 $\pm$ 5,5	70 $\pm$ 4,3	68 $\pm$ 4,7
gesamt	127	69 $\pm$ 13,3	71 $\pm$ 8,3	67 $\pm$ 11,5

Nach Adaption ergaben sich für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien folgende Mittelwerte: CVM 69%, Schätzung Mikroskop 71%, Schätzung Monitor 67% (Tab.10; Abb.5). Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen Computerauswertung und Schätzung am Monitor sowie zwischen den beiden subjektiven Verfahren (t-Test; $p < 0,05$). Die Korrelationskoeffizienten lagen bei $r = 0,31$ (CVM/Mikroskop) und $r = 0,49$ (CVM/Monitor) ($p < 0,01$).

Tab.11: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nach Auftauen (Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstationen);
 $\bar{X} \pm s$, n = Anzahl der Ejakulate

Station	n	Computer- auswertung	Schätzung Mikroskop	Schätzung Monitor
1	10	51 $\pm$ 15,5	50 $\pm$ 12,4	44 $\pm$ 13,9
2	12	48 $\pm$ 12,4	56 $\pm$ 5,6	46 $\pm$ 11,0
3	11	41 $\pm$ 12,7	43 $\pm$ 12,7	38 $\pm$ 12,1
4	13	58 $\pm$ 9,1	63 $\pm$ 9,2	56 $\pm$ 13,8
5	8	37 $\pm$ 8,8	57 $\pm$ 9,4	54 $\pm$ 4,8
6	24	47 $\pm$ 11,9	58 $\pm$ 8,6	59 $\pm$ 8,4
7	10	51 $\pm$ 10,7	52 $\pm$ 13,2	52 $\pm$ 12,3
8	8	58 $\pm$ 7,9	63 $\pm$ 6,6	62 $\pm$ 4,9
9	10	40 $\pm$ 12,2	56 $\pm$ 7,6	38 $\pm$ 7,6
10	12	60 $\pm$ 11,7	50 $\pm$ 6,7	49 $\pm$ 6,2
11	9	61 $\pm$ 10,0	56 $\pm$ 8,2	47 $\pm$ 4,2
gesamt	127	50 $\pm$ 13,4	55 $\pm$ 10,6	50 $\pm$ 12,1

Bei der Untersuchung der Proben nach dem Auftauen (Tab.11; Abb.5) lag der Mittelwert der Schätzung am Mikroskop mit 55% vorwärtsbeweglichen Spermien signifikant über den Werten von CVM (50%) und Schätzung am Monitor (50%) (t-Test; $p < 0,05$). Die Korrelationskoeffizienten lagen bei $r = 0,48$ (CVM/Mikroskop; $p < 0,01$) und $r = 0,62$ (CVM/Monitor; $p < 0,01$).

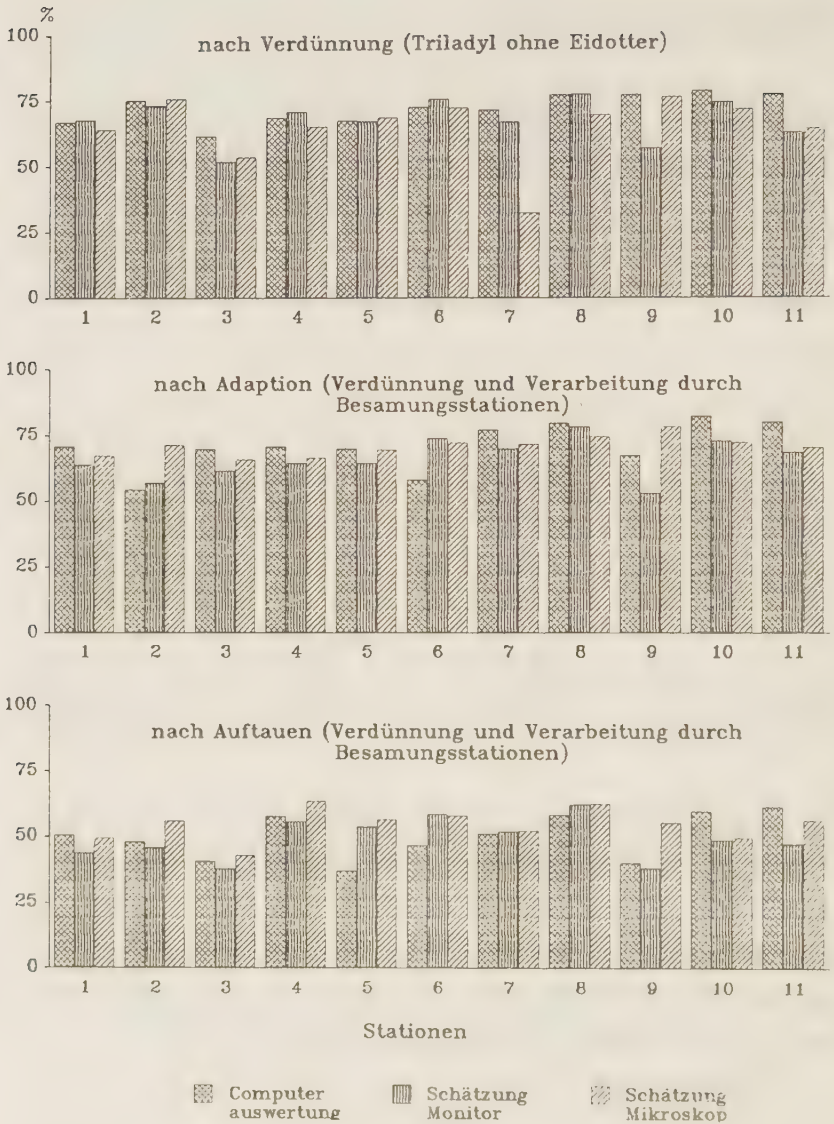


Abb. 5: Beurteilung der Motilität von Bullenspermien – Vergleich von Computerauswertung, Schätzung am Monitor und Schätzung im mikroskopischen Bild (% vorwärtsbewegliche Spermien)

Tab.12: Korrelationskoeffizienten aus subjektiver Schätzung und Computerauswertung je Besamungsstation

Station	n	Schätzung Mikroskop /Computerauswertung	Schätzung Monitor /Computerauswertung
1	30	0,70**	0,72**
2	36	0,79**	0,95**
3	33	0,78**	0,85**
4	39	0,43*	0,75**
5	24	0,68**	0,90**
6	72	0,65**	0,82**
7	30	0,24	0,82**
8	24	0,72**	0,93**
9	30	0,82**	0,88**
10	36	0,87**	0,87**
11	27	0,75**	0,85**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten aus subjektiv und objektiv erhobenen Motilitätswerten an den verschiedenen Besamungsstationen (Tab.12) zeigt mit einer Ausnahme signifikante Ergebnisse. Die r-Werte aus dem Vergleich von Schätzung am Videomonitor und Computerauswertung waren wesentlich höher als die, die sich aus mikroskopischer Schätzung und Bildanalyse errechnen ließen. Eine Ausnahme bildete hier die Station 10, bei der die Korrelationskoeffizienten übereinstimmen.

4.3. Vergleich der Verfahren durch Beurteilung der Motilität am Videomonitor durch mehrere Untersucher und Computervideomikrographie

Während im ersten Versuchsabschnitt jeder Untersucher nur die an der entsprechenden Besamungsstation erstellten Proben und Videoaufnahmen einer Motilitätsschätzung unterzog, wurden im zweiten Versuchsabschnitt die Videoaufnahmen von 99 ausgewählten Gesichtsfeldern (TG-konserviertes Sperma) 11 Untersuchern zur Beurteilung der Motilität vorgelegt. Der Mittelwert der Computerauswertung aller verwendeten Gesichtsfelder ergab für den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien 49,1%. Die Mittelwerte der Schätzungen für dieselben Gesichtsfelder lagen zwischen 38,2% und 64,6% vorwärtsbeweglichen Spermien (Abb.6; Tab.13).

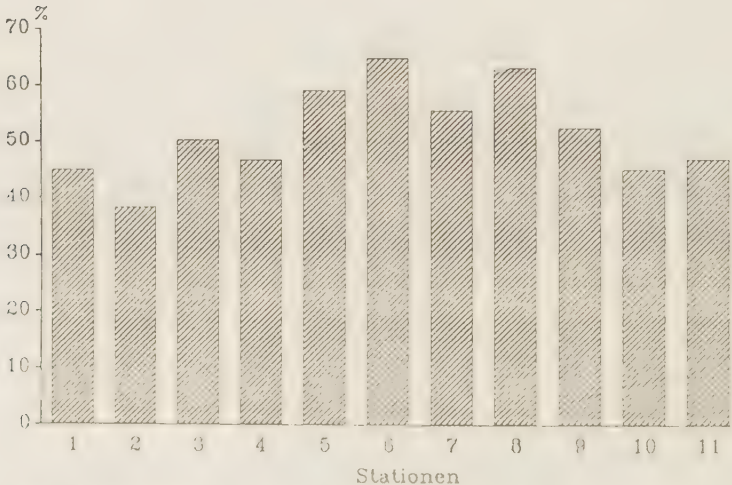


Abb. 6: Mittelwerte aus der Schätzung von 99 Gesichtsfeldern durch verschiedene Untersucher am Videomonitor (Ergebnis der Computerauswertung $\bar{x} = 49,1\%$ vorwärtsbewegliche Spermien)

Tab.13: Mittelwerte und Standardabweichungen aus der Schätzung von 99 Gesichtsfeldern am Videomonitor durch elf Untersucher und Korrelationskoeffizienten (r) zu den "Computerwerten" (n = 99; $\bar{X} \pm s = 49,1 \pm 12,5$)

Station	% vorw. bewegl. Spermien	r
1	44,9 $\pm$ 9,6	0,56**
2	38,2 $\pm$ 9,7	0,82**
3	50,1 $\pm$ 8,4	0,67**
4	46,5 $\pm$ 12,8	0,74**
5	59,0 $\pm$ 4,2	0,71**
6	64,6 $\pm$ 8,9	0,63**
7	55,3 $\pm$ 11,7	0,70**
8	62,9 $\pm$ 10,0	0,79**
9	52,1 $\pm$ 11,4	0,85**
10	44,8 $\pm$ 8,6	0,81**
11	46,6 $\pm$ 5,9	0,66**

** p < 0,01

Die Korrelation zwischen Schätzung am Monitor und Bildanalyse (Tab.13) war für jeden der Untersucher signifikant (r = 0,56 bis r = 0,85; p > 0,01). Der t-Test ergab in zehn Fällen einen signifikanten Unterschied zwischen Schätzung und Computerauswertung (p > 0,01). Bei einem Untersucher war bei einem Mittelwert von 50,1% vorwärtsbeweglicher Spermien aus den Schätzungen kein signifikanter Unterschied zur Bildanalyse festzustellen. Auch zwischen den Ergebnissen der einzelnen Untersucher traten teilweise erhebliche Differenzen auf (Tab.13).

Tab.14: Verteilung der Differenzen zwischen Schätzung und Computeranalyse (n=99). Zur Darstellung wurde der prozentuale Anteil der Schätzungen mit den angegebenen Abweichungen berechnet.

Station	Abweichung der Schätzung zur Computerauswertung nach unten			Abweichung der Schätzung zur Computerauswertung nach oben		
	>20%	10-20%	bis 10%	bis 10%	10-20%	>20%
1	8	26	28	30	7	1
2	12	46	36	6	-	-
3	1	9	34	40	15	1
4	6	12	40	36	6	-
5	-	2	13	38	30	17
6	-	1	3	28	32	36
7	-	4	23	40	27	6
8	-	-	5	27	51	17
9	-	3	30	52	14	1
10	1	21	49	28	1	-
11	3	18	42	28	9	-
gesamt	3	13	28	32	17	7

Von den 1089 Schätzwerten lagen insgesamt 56% über den Ergebnissen der Computerauswertung, 44% darunter. Eine ähnliche Verteilung zeigten die Schätzungen der Untersucher der Stationen 3 (56% bzw. 44%) und 4 (42% bzw. 58%). Bei den Stationen 6 und 8 lagen die Schätzwerte fast regelmäßig über den Ergebnissen der Bildanalyse, bei der Station 2 fast ausschließlich darunter. 60% der Schätzwerte wiesen eine maximale Differenz zur Computerauswertung von $\pm 10\%$ auf (Tab.14). Um zu

überprüfen, ob der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bzw. die Höhe der Spermengeschwindigkeit in einer Probe einen Einfluß auf die subjektive Schätzung haben, wurden die untersuchten Gesichtsfelder anhand der Computeranalyse in "bessere" und "schlechtere" Proben unterteilt. Die Differenzen zwischen subjektiver und objektiver Methode wurden für beide Gruppen getrennt berechnet (Tab.15).

Proben, die weniger als 50% vorwärtsbewegliche Spermien aufwiesen, wurden von den Untersuchern insgesamt in 73% der Fälle, solche mit mehr als 50% motilen Samenzellen bei 40% der durchgeführten Schätzungen höher bewertet. Bei der Unterteilung nach der Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien wurden die "schnellen" Proben hinsichtlich des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien häufiger höher eingeschätzt (60%) als Proben mit einem höheren Anteil "langsamer" Spermien (54%).

Tab.15: Verteilung der Differenzen zwischen Schätzung und Computerauswertung bei selektierten Proben. Zur Darstellung wurde der prozentuale Anteil der Schätzungen mit den angegebenen Abweichungen berechnet.

Station	Abweichung der Schätzung zur Computerauswertung					
	nach unten			nach oben		
	>20%	10-20%	bis 10%	bis 10%	10-20%	>20%
< 50%(1)	0	5	22	37	23	13
≥ 50%(1)	5	22	33	28	11	1
< 53µm/Sek.(2)	3	15	29	32	15	6
≥ 53µm/Sek.(2)	3	11	26	32	20	8

(1) Proben mit weniger als 50% vorwärtsbeweglichen Spermien
laut CVM (n = 50) bzw. 50% und darüber (n = 49)

(2) Proben mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit der vor-
wärtsbeweglichen Spermien von weniger als 53 µm/Sek.
(n = 52) bzw. 53 µm/Sek. und darüber (n = 47)

Tab.16: Mittelwerte aus zwei Schätzungen von je neun identischen Gesichtsfeldern durch denselben Untersucher am Videomonitor

Station	1. Schätzung am Monitor Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien	2. Schätzung am Monitor
1	41 ± 3,3	53 ± 6,1 **
2	34 ± 3,9	38 ± 5,0 *
3	38 ± 3,6	52 ± 3,6 **
4	35 ± 10,3	32 ± 5,6
5	59 ± 2,2	59 ± 2,2
6	62 ± 2,5	73 ± 2,6 **
7	59 ± 3,0	49 ± 3,0 **
8	58 ± 2,6	70 ± 4,3 **
9	36 ± 3,9	32 ± 2,5 **
10	47 ± 4,4	53 ± 3,5 **
11	45 ± 0	47 ± 3,5

* Differenz zur 1. Schätzung $p < 0,05$; t-Test

** Differenz zur 1. Schätzung $p < 0,01$; t-Test

Jeweils neun Gesichtsfelder waren von jedem Untersucher bereits im ersten Versuchsabschnitt einer Motilitätsschätzung unterzogen worden. Die Gegenüberstellung der Mittelwerte aus 1. und 2. Schätzung zeigt die Tabelle 16. Bei einem Untersucher stimmten die Ergebnisse beider Schätzungen überein. Acht der elf am Versuch beteiligten Personen kamen zu signifikant verschiedenen Ergebnissen (t-Test; $p < 0,01$ bzw. $0,05$).

4.4. Non-Return-Raten und Motilitätsparameter

Um zu überprüfen, ob eine Beziehung zwischen der Non-Return-Rate und den Motilitätsparametern eines Ejakulates besteht, wurden folgende Parameter tiefgefrier-konservierter Samenproben ausgewählt:

- Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien
(Computerauswertung, Schätzung am Monitor bzw. Mikroskop)
- Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien
- Prozentsatz der Spermien, die sich schneller als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ vorwärtsbewegten

Die Mittelwerte dieser Parameter in den 73 Ejakulaten stimmten mit denen aus dem Gesamtmaterial überein. Eine Ausnahme bildete allerdings der Prozentsatz der Spermien, die sich mit mehr als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ vorwärtsbewegten. Hier lag der Mittelwert aus allen untersuchten TG-konservierten Samenproben höher als der aus den Ejakulaten, von denen Non-Return-Raten vorlagen. Dies ist vor allem durch den erheblich höheren Anteil solcher Zellen in den Proben der Station 1 bedingt. Von dieser Station gingen jedoch keine Non-Return-Raten in die Berechnung ein.

Die Korrelation der Motilitätsparameter zu den Non-Return-Raten war in keinem Fall signifikant. Die Korrelationskoeffizienten (r) bewegten sich zwischen 0,06 und 0,12 (Tab.17).

Um überprüfen zu können, ob diese Motilitätsparameter gewisse Tendenzen bei "extremen" Abweichungen des Befruchtungsvermögens erkennen lassen, wurden retrospektiv je 10 Ejakulate mit den

besten bzw. schlechtesten Non-Return-Ergebnissen gesondert ausgewertet (Tab.18). Die sogenannten "schlechten" Ejakulate wiesen Befruchtungsergebnisse von 33,6% bis 55,% ($\bar{x}$ = 50,8%) auf, während die der "guten" Ejakulate zwischen 70,8% und 78,5% ($\bar{x}$ = 73,8%) lagen (Differenz zwischen dem Mittelwert der Gruppen "schlecht" und "gut"; $p < 0,01$; t-Test). Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen (Computerauswertung) betrug im Mittel 46,9 in "schlechten" und 58,7 in "guten" Ejakulaten ($p < 0,05$; t-Test). Auch beim Anteil der Spermien, die sich mit mehr als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ vorwärtsbewegten war ein signifikanter Unterschied nachzuweisen (7,1% bzw. 11,7%; $p < 0,05$; t-Test).

Tab.17: Motilitätsparameter ($\bar{x} \pm s$; n = 73) in Tiefgefrier-Samenproben und Korrelation (Korr.-koeffizient r) zur Non-Return-Rate (73 Ejakulate; min. 43, max. 321 Erstbesamungen)

Parameter	$\bar{x} \pm s$	r
Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien		
- Schätzung Mikroskop	55,3 $\pm$ 9,62	0,07
- Schätzung Monitor	50,4 $\pm$ 12,72	0,06
- Computerauswertung	49,6 $\pm$ 12,82	0,12
Geschw. $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (1)	54,1 $\pm$ 4,59	0,06
schneller als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}(\%)$ (2)	8,8 $\pm$ 5,78	0,09
Non-Return-Rate %	63,5 $\pm$ 7,46	

(1) Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien

(2) Prozentsatz Spermien schneller als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$

Tab.18: Vergleich von Motilitätsparametern in Tiefgefrier-Samenproben bei jeweils 10 Ejakulaten mit den höchsten bzw. niedrigsten Non-Return-Raten ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	hohe NRR % 70,7 - 78,5	niedrige NRR % 33,6 - 55,9
Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien		
- Schätzung Mikroskop	59,7 $\pm$ 5,63	55,0 $\pm$ 8,16
- Schätzung Monitor	54,2 $\pm$ 12,72	47,9 $\pm$ 13,01
- Computerauswertung	58,7 $\pm$ 13,64*	46,9 $\pm$ 12,61
Geschw. $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ (1)	55,2 $\pm$ 4,48	53,0 $\pm$ 3,89
schneller als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}(\%)$ (2)	11,7 $\pm$ 7,36*	7,1 $\pm$ 3,40
Non-Return-Rate %	73,8 $\pm$ 2,40**	50,8 $\pm$ 6,59

(1) Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien

(2) Prozentsatz Spermien schneller als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$

* Differenz zu Ejakulaten mit niedriger NRR p < 0,05 (t-Test)

** Differenz zu Ejakulaten mit niedriger NRR p < 0,01 (t-Test)

5. DISKUSSION

Die Beurteilung der Motilität, d.h. die subjektive Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien, ist neben der Bestimmung der Spermienkonzentration das entscheidende Kriterium für die Verwendbarkeit eines Ejakulates (BARTOOV et al., 1981). Vor allem die mikroskopische Untersuchung des tiefgefrorenen Spermas nach dem Auftauen dient als Qualitätskontrolle vor dem Einsatz der Pailletten in der künstlichen Besamung. Im Hinblick auf die Forensik ist von Bedeutung, daß die Gewährschaftsbedingungen für Bullen einen Anteil von mindestens 50% vorwärtsbeweglichen Samenzellen nach der Tiefgefrierkonservierung in zwei Dritteln der Ejakulate fordern. Bei Nativsperma werden 70% vorwärtsbewegliche Spermien verlangt. Bei einer Schätzung handelt es sich jedoch eher um die Wiedergabe eines subjektiven Eindrucks als um eine Methode, mit der das Vorhandensein exakt vorgegebener prozentualer Anteile ermittelt werden kann. VAN DUIJN et al. (1971) und JOUANNET et al. (1977) stellten fest, daß auch durch langjährige Erfahrung die Reproduzierbarkeit subjektiver Schätzungen nicht verbessert wird. Dies ist seit langem bekannt, und es hat nicht an Bemühungen um praktikable objektive Verfahren zur Bestimmung der Spermienmotilität gefehlt. Keines dieser Verfahren hat sich jedoch bis heute in der Praxis durchgesetzt. Der Einsatz im Routinebetrieb an den Besamungsstationen scheiterte an zu großem zeitlichen, personellen oder technischen Aufwand.

Durch die vorliegende Arbeit sollten zum einen die Ergebnisse der Motilitätsbestimmung anhand der Computer-Videomikrographie mit den Schätzungen einer möglichst großen Anzahl verschiedener Untersucher verglichen werden und zum anderen die Eignung der Computer-Videomikrographie (LEIDL et al., 1987; RIEMKE und LEIDL, 1985) für den praktischen Einsatz überprüft werden.

Die für diese Arbeit ausgewerteten Videoaufnahmen entstanden während der routinemäßigen Verarbeitung von Ejakulaten an elf Besamungsstationen. Die Aufstellung der benötigten Geräte bereitete in keinem Labor Schwierigkeiten. Die aufgezeichneten Proben wurden nachträglich an der Klinik ausgewertet, um einen Transport des Computers zu vermeiden. Prinzipiell besteht jedoch auch die Möglichkeit, das mikroskopische Bild direkt, d.h. ohne Aufzeichnung, auszuwerten. Die verwendete Programmversion benötigt zur Analyse eines Gesichtsfeldes ca. 20 Sek..

Bedingt durch den Auswertungsmodus der Computer-Videomikrographie (optimale Spermienkonzentration etwa 50000/ μ l) konnte Nativsperma nicht untersucht werden. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beim Ausgangsmaterial zu gewährleisten, wurde eine der Untersuchungstechnik angepaßte Verdünnung mit einem standardisierten Verdünner angefertigt. Einflüsse der an den verschiedenen Stationen verwendeten Verdünner, der Verdünnungstechnik und des Zeitpunktes der dort üblichen mikroskopischen Motilitätsschätzung konnten so ausgeschaltet werden. Aus diesem Grund wurden auch für den Vergleich von objektiver und subjektiver Methode bei verdünntem Sperma nur die Ergeb-

nisse der für den Versuch hergestellten Proben herangezogen.

Die objektive Bestimmung der beiden Motilitätsparameter Vorwärtsbewegung und Geschwindigkeit zeigt, daß sich der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und die Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien im Verlauf der Verarbeitung der Ejakulate unterschiedlich verhalten. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen lag bei den verdünnten Proben im Durchschnitt bei 71,9%, sank während der Adaptionszeit auf 69% und ging während der Tiefgefrierkonservierung um fast 20% auf 49,9% zurück. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien sank während der Adaptionszeit von 73,2 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ auf 59,4 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$. Nach dem Auftauen konnten noch 55,8 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ gemessen werden. Die Streubreite der Geschwindigkeit war in den drei untersuchten Verarbeitungsstufen wesentlich geringer als die des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien. Der Prozentsatz linear vorwärtsbeweglicher Samenzellen sowie deren Geschwindigkeit waren in jeder Verarbeitungsstufe signifikant korreliert mit den entsprechenden Werten aller vorwärtsbeweglichen Spermien. Eine gesonderte Beurteilung dieser Parameter erscheint daher bei Bullensperma nicht notwendig.

Die Veränderung der gesamten Vorwärtsbewegung im Vergleich von verdünnten (mit Triladyl ohne Eidotter) und adaptierten Proben (Verdünnung und Verarbeitung durch die Besamungsstationen) verlief jedoch bei den einzelnen Stationen unterschiedlich. Während bei den meisten Stationen der Prozentsatz vorwärtsbe-

weglicher Spermien nach Adaption etwas höher lag, zeigten die Ejakulate von Station 2, 6 und 9 einen Abfall der Motilität. Diese drei Stationen weichen von der an den anderen Stationen üblichen Adaptionstechnik ab. Hierauf soll im Rahmen dieser Arbeit, um die Anonymität der einzelnen Stationen zu gewährleisten, nicht näher eingegangen werden.

Bei der Betrachtung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen zeigt sich, daß bei den Stationen 2, 6 und 9 die Motilität in Relation zum Ausgangswert am stärksten abgenommen hat, wobei die Ejakulate der Stationen 2 und 6 durch den Tiefgefriervorgang weniger vorwärtsbewegliche Spermien einbüßten als durch die Adaption. In den Ejakulaten der Station 9, bei der auch die Tiefgefrierkonservierung in anderer Weise vorgenommen wird, sank die Motilität am weitesten ab. Der größere Rückgang der Vorwärtsbewegung fand hier während des Tiefgefrierens statt. Einen erheblichen Motilitätsabfall zeigten auch die Ejakulate der Station 5, die zur Zeit der Untersuchung die Methodik des Einfriervorgangs versuchsweise modifizierte.

Die Differenzierung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien in lineare und nicht lineare Bewegungsformen zeigt, daß beim Bullen der Anteil nicht linear vorwärtsbeweglicher Spermien gering ist. Die Anteile vorwärtsbeweglicher und linear vorwärtsbeweglicher Spermien verhalten sich selbst in den verschiedenen Verarbeitungsstufen der Tiefgefrier-Konservierung gleichsinnig (Korrelationskoeffizient r zwischen 0,94

und 0,98). Eine Differenzierung beim Anteil beweglicher Spermien in "linear" und "nicht linear" vorwärtsbeweglich erscheint deshalb unnötig.

Der Rückgang der Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien in den untersuchten Ejakulaten der einzelnen Besamungsstationen verläuft in den drei Verarbeitungsstufen einheitlich. Die Unterschiede zwischen der Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien und der der linear vorwärtsbeweglichen ist gering. Eine Ausnahme bildet allerdings die Station 1, bei der die Durchschnittsgeschwindigkeit weder durch die Adaption noch durch die Tiefgefrierkonservierung beeinflusst wurde, während die Ausgangsgeschwindigkeit sich nicht von der der übrigen Stationen unterschied. Diese Station konfektionierte den Samen in Pelletform und benutzt dazu einen Lactose-Verdünner sowie eine spezielle Auftaulösung. MÜLLER (1976) stellte die größte Haltbarkeit von TG-Samen bei der Verwendung eines Laktose-Eidotter-Glyzerin-Verdünners (NAGASE et al., 1964) unter Zusatz eines Auftauverdünners (LEIPNITZ, 1965) fest. Ob die erheblich höhere Durchschnittsgeschwindigkeit der Spermien im adaptierten und im aufgetauten Sperma dieser Besamungsstation auf die Art des verwendeten Verdünners zurückzuführen ist oder auf andere physikalische Faktoren, die sich durch die Pelletierung ergeben, wurde nicht überprüft.

Bei der subjektiven Beurteilung der Proben ergibt sich hinsichtlich der Mittelwerte aus allen Untersuchungen sowohl im mikroskopischen Bild als auch am Videomonitor eine gute Übereinstimmung mit den durch Computer-Videomikrographie ermittelten Daten. Die Korrelation zwischen subjektiv und objektiv bestimmten Werten liegt bei der Schätzung am Videomonitor höher als bei der im mikroskopischen Bild; die Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Untersucher verhalten sich entsprechend. Diese Übereinstimmung erklärt sich aus der Tatsache, daß bei der Schätzung am Videomonitor dieselben Gesichtsfelder untersucht werden wie bei der computergesteuerten Bildanalyse, während bei der Schätzung im mikroskopischen Bild die individuelle Technik der Probenentnahme und der Anfertigung der Präparate berücksichtigt werden muß. Auf dieser Problematik beruht vermutlich auch das Auftreten eines nicht signifikanten Korrelationskoeffizienten beim Vergleich von Schätzung im mikroskopischen Bild und Computer-Videomikrographie (bei "guter" Korrelation zwischen Schätzung am Videomonitor und Computerauswertung für denselben Untersucher). Bei beiden subjektiven Verfahren liegen die Schätzungen etwa zu gleichen Teilen oberhalb und unterhalb der Ergebnisse der Computer-Videomikrographie. Innerhalb eines Bereichs von $\pm 10\%$ Abweichung zur Bildanalyse liegen bei der Schätzung im mikroskopischen Bild 58% der Ergebnisse, bei der Schätzung am Videomonitor 64%. Bei der Interpretation dieser Werte ist zu beachten, daß an allen beteiligten Besamungsstationen die Angabe der geschätzten Motilität in 5%-Schritten erfolgt und daher die Abweichungen innerhalb dieses Bereiches als gering

zu betrachten sind. Bei subjektiver Beurteilung der Proben der verschiedenen Verarbeitungsstufen zeigt sich, daß bei den Untersuchungen nach der Adaptionszeit die Korrelationskoeffizienten zwischen Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien und Computer-Videomikrographie wesentlich niedriger waren als die, die nach Verdünnung und nach Auftauen errechnet werden konnten. Im Gegensatz zu diesen Proben enthält das Sperma nach der Adaptionszeit einen geringeren Anteil linear vorwärtsbeweglicher Samenzellen. VAN DUIJN et al. (1971) stellten fest, daß die Übereinstimmung von subjektiver und objektiver Methode bei einem hohen Anteil von Spermien mit linearer Bewegungsform am besten ist.

Beim Vergleich der Schätzungen derselben Gesichtsfelder durch mehrere Untersucher lagen die Mittelwerte der Schätzungen vorwärtsbeweglicher Spermien zwischen 38,2% und 64,6%. Bei denselben Proben wurden durch Computer-Videomikrographie 49,9% vorwärtsbewegliche Spermien ermittelt. Die Korrelation zwischen subjektivem und objektivem Verfahren ist für jeden Untersucher signifikant und entspricht den von anderen Autoren ermittelten Werten (MÜLLER, 1968 und VAN DUIJN et al., 1971, Fotogrammetrie). WALKER et al. (1982) errechneten höhere Werte, GSCHWEND (1986) kam zu niedrigeren Ergebnissen. Beide Autoren verglichen die Schätzwerte mit einer Computer-Bildanalyse. Auch die Abweichungen der subjektiven Schätzungen des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Samenzellen untereinander zeigten Übereinstimmung mit den im Schrifttum gefundenen Differenzen (GASSNER et al., 1959, VAN DUIJN et al., 1971, JOUANNET et

al., 1977). Die Gegenüberstellung der Schätzwerte verschiedener Untersucher aus identischen Gesichtsfeldern zeigt, von wenigen Ausnahmen abgesehen, statistisch signifikante Unterschiede. Der t-Test ergibt auch in diesem Versuchsabschnitt signifikante Abweichungen zwischen dem subjektiven und dem objektiven Verfahren. Eine Ausnahme bildet die Station 3. Hier ist kein signifikanter Unterschied zur Computerauswertung vorhanden.

Wie im ersten Versuchsabschnitt liegen auch bei diesen Untersuchungen die Schätzwerte zu etwa gleichen Teilen oberhalb und unterhalb der Ergebnisse der Computer-Videomikrographie; ebenso liegen mehr als die Hälfte der subjektiv ermittelten Daten in einem Bereich von $\pm 10\%$ zu den durch die objektive Methode erhaltenen Werten. Bei der Betrachtung der Schätzwerte einzelner Untersucher zeigt sich jedoch, daß teilweise mehr als 90% der Ergebnisse sowohl über als auch unter den Daten der Bildanalyse lagen. Daraus ergibt sich, in Verbindung mit den ausnahmslos hochsignifikanten Korrelationskoeffizienten, daß die Untersucher die Unterschiede zwischen Spermaproben hinsichtlich des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien auf einer individuellen Basis beurteilen, wobei jedoch ein Vergleich zwischen Motilitätsschätzungen, die an verschiedenen Besamungsstationen durchgeführt wurden, kaum durchführbar erscheint (BARTOOV et al., 1981). Die Problematik der subjektiven Beurteilung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien wird besonders deutlich beim Vergleich von zwei Schätzungen derselben Videoaufnahmen durch einen Untersucher. An

den 11 am Versuch beteiligten Besamungsstationen (entspricht 11 Untersuchern) werden bei der zweiten Schätzung in 8 Fällen Ergebnisse ermittelt, die sich signifikant von denen ihrer eigenen ersten Untersuchung unterscheiden.

Um den Einfluß der Motilitätsparameter Vorwärtsbewegung und Geschwindigkeit auf die subjektive Beurteilung zu überprüfen, wurden die untersuchten Proben hinsichtlich dieser Eigenschaften jeweils in zwei Gruppen eingeteilt. In Übereinstimmung mit BAKER et al. (1957) und MÜLLER (1968) kann festgestellt werden, daß Spermaproben mit einem hohen Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen häufig zu niedrig bewertet werden. Da umgekehrt Proben mit einer Motilität von unter 50% vorwärtsbeweglichen Zellen häufiger besser beurteilt werden, liegt die Vermutung nahe, daß die Schätzungen unbewußt von dem "Soll" von 50% vorwärtsbeweglichen Spermien bei aufgetautem Sperma beeinflußt werden. Auch die Durchschnittsgeschwindigkeit der Spermien scheint einen Einfluß auf die mikroskopische Beurteilung zu haben, da "schnellere" Proben häufig besser eingeschätzt wurden als solche mit einer niedrigeren Durchschnittsgeschwindigkeit.

Im Rahmen dieser Untersuchung ergab sich die Möglichkeit, bei einem Teil der Bullen die Non-Return-Rate der untersuchten Einzelejakulate in die Auswertung einzubeziehen. Dabei zeigte sich, daß sowohl der "subjektiv" ermittelte Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen als auch die "objektiv" bestimmten Motilitätsparameter keine Beziehung zur NRR des betreffenden Eja-

kulates aufwiesen.

Dieses Ergebnis kann mit dem Einfluß verschiedener Faktoren erklärt werden. Die Selektion der Besamungsbullen durch Gewährschaftsbedingungen und laufende Kontrollen der Spermienqualität bedingen eine gravierende Einengung der biologischen Bandbreite (LINFORD and GLOVER, 1976; ZIEGLER, 1984). Darüberhinaus ist das tatsächliche Befruchtungsergebnis einer Samenprobe das Resultat vieler verschiedener Eigenschaften der Samenzellen. So ist der Einfluß der Spermienmorphologie, insbesondere die Beschaffenheit des Akrosoms auf das Befruchtungsvermögen des Spermiums nachgewiesen (SAACKE und WHITE, 1972). Hinzu kommt, daß die NRR des einzelnen Ejakulates auf einer relativ kleinen Anzahl von Besamungen beruht. Daher treten andere Faktoren, die das Befruchtungsergebnis beeinflussen können, wie z.B. Besamungstechnik und Fruchtbarkeitslage der Kuh, stärker in Erscheinung.

Die Aufgliederung der Ejakulate in solche mit "guter" bzw. "schlechter" Non-Return-Rate ergab, daß sowohl der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen als auch der Prozentsatz von Spermien, die sich mit mehr als 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ bewegten, in beiden Gruppen signifikant verschieden war. Ähnliche Beobachtungen machte auch GSCHWEND (1986). Im Einzelfall dürfte es jedoch nicht möglich sein, auch bei Bestimmung der Motilitätsparameter mit der Computer-Videomikrographie, das Befruchtungsergebnis eines Ejakulates vorauszusagen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, Ejakulate mit besonders niedrigen Werten bei den

Motilitätsparametern zu eliminieren und so das durchschnittliche Befruchtungsergebnis zu verbessern.

Schlußfolgerung:

Die Ergebnisse zeigen, daß bei insgesamt guter Übereinstimmung von subjektiver Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien und Computer-Videomikrographie die Differenzen im Einzelfall erheblich sind. Dies trifft nicht nur beim Vergleich der Untersuchung im mikroskopischen Präparat und der Bildanalyse der Videoaufnahmen bei der gleichen Probe zu (wobei jeweils die Technik der Präparatanfertigung zu berücksichtigen ist), sondern auch auf den Vergleich von Schätzung am Monitor und Bildanalyse identischer Gesichtsfelder. Die mangelnde Reproduzierbarkeit subjektiver Schätzungen des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Samenzellen zeigt sich vor allem bei der Gegenüberstellung von Ergebnissen verschiedener Untersucher aus identischen Gesichtsfeldern, ebenso wie bei wiederholten Schätzungen desselben Untersuchers. Es wird die Tendenz deutlich, in Relation zur Computer-Videomikrographie entweder durchgehend höher oder niedriger zu schätzen. Für den Routinebetrieb einer Besamungsstation sind diese Abweichungen unerheblich, solange die Untersuchungen immer von derselben Person durchgeführt werden; in forensischer Hinsicht und für den Vergleich von Ejakulaten verschiedener Herkunft, wie z.B. beim Export oder beim Austausch von TG-Sperma erforderlich, scheint die subjektive Schätzung jedoch weniger geeignet. Der geringe zeitliche, technische und personelle Aufwand für die Computer-Videomikrographie, verbunden mit der Möglichkeit

einer einfachen Dokumentation der Untersuchungsergebnisse und der untersuchten Gesichtsfelder, lassen diese Methode der Spermauntersuchung auch für den Routinebetrieb an Besamungsstationen als geeignet erscheinen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, subjektive Schätzungen des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien mit den Ergebnissen der computergesteuerten Videomikrographie zu vergleichen. Außerdem sollte die Eignung des verwendeten Bildanalyse-Systems für den Einsatz an Besamungsstationen überprüft werden.

In den Versuch wurden 127 Ejakulate aus der routinemäßigen Spermagewinnung 11 bayerischer Besamungsstationen einbezogen. Jedes Ejakulat wurde nach der Verdünnung, nach der Adaptionszeit und nach dem Auftauen untersucht. Die Analyse durch den Computer zeigte, daß die Durchschnittsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien bereits durch die Adaption erheblich zurückgeht, während der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien erst durch die Tiefgefrierkonservierung eine größere Reduzierung erfährt. Zwischen den einzelnen Besamungsstationen konnten hinsichtlich Vorwärtsbewegung und Geschwindigkeit der Spermien Unterschiede, wahrscheinlich in Folge verschiedener Verarbeitungsmethoden, nachgewiesen werden.

Bei insgesamt guter Übereinstimmung der Durchschnitte von Computer-Videomikrographie-Werten und subjektiver Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien waren die Unterschiede im einzelnen erheblich. Die Schätzung wird, außer vom Untersucher, sowohl vom Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen als auch von deren Geschwindigkeit und Bewegungsform beeinflusst.

Unterschiede im Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen verschiedener Spermaproben wurden von jedem Untersucher auf einer individuellen Basis beurteilt, eine Vergleichbarkeit von Motilitätsschätzungen verschiedener Untersucher war jedoch nicht gegeben.

Zwischen den durch Schätzung bzw. Bildanalyse ermittelten Motilitätsparametern und den Non-Return-Raten der betreffenden Ejakulate war im Gesamtmaterial keine signifikante Korrelation gegeben. Ejakulate mit hohen NRR wiesen jedoch einen signifikant höheren Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien sowie an Spermien mit einer Mindestgeschwindigkeit von 70 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ auf als solche mit niedriger Non-Return-Rate.

Der Einsatz der "Computer-Videomikrographie" im Routinebetrieb einer Besamungsstation erscheint nach eigenen Erfahrungen praktikabel. Diese Methode könnte dazu beitragen, die Nachteile der subjektiven Beurteilung der Spermienmotilität zu vermeiden.

7. SUMMARY

Comparative study on the motility of bull spermatozoa by means of computer-assisted videomicrography (CVM) as opposed to subjective estimates.

The purpose of this study was to compare subjective estimates of the percentage of forward moving spermatozoa with the results obtained by computer-assisted evaluation. The practicability of using the videomicrographic system in AI centers was also evaluated.

127 ejaculates from 11 Bavarian AI centers were videotaped after dilution, equilibration and freezing. Equilibration of diluted sperm samples, as determined by CVM, already led to a significant decline in average velocity, whereas the percentage of forward-moving spermatozoa was reduced only in frozen-thawed samples. Significant differences were determined among various AI centers in the velocity of spermatozoa and the percentage of forward-moving spermatozoa during the processing procedures.

The means of the computer results were not different from the means of the estimates. However, results of individual samples differed considerably. Microscopic evaluations were influenced by the percentage of forward moving cells as well as their velocity and movement patterns.

Deviations in assessing the percentage of forward-moving cells in various ejaculates were found to be within a constant range for each individual examiner. Differences among examiners were rather high.

There were no significant correlations between estimates of sperm motility or the results of CVM to the NRR of the ejaculate examined. In ejaculates with high NRR, more forward moving spermatozoa and fast-moving spermatozoa ($>70 \mu\text{m/s}$) were found ($p \leq 0,05$).

According to the data presented, the routine use of the computer-assisted videomicrography in AI centers can be recommended in order to avoid the disadvantages of subjective estimates.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ATHERTON, R.W. (1975):

An objective method for evaluating Angus and Hereford sperm motility.

Int.J.Fertil. 20, 109-112.

BAKER, F.N., R.G. CRAGLE and G.W. SALISBURG (1957):

Spermatozoan velocities in vitro.

Fert.Steril. 8, 149-155.

BARTOOV, B., D.KALAY and A. MAYEVSKY (1981):

Sperm motility analyser (SMA), a practical tool of motility and cell concentration determinations in artificial insemination centers.

Theriogenology, 15 (2), 173-182.

GASSNER, F.X., J.W. GOLDZIEHER, J.F. MASKEN and M.L. HOPWOOD (1959):

The objective measurement of sperm motility.

Fert.Steril. 10, 488-501.

GSCHWEND, H.-J. (1986):

Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien, insbesondere über den Einfluß ihrer Geschwindigkeit auf das Befruchtungsvermögen.

Vet.med.Diss., München.

JOUANNET, P., B. VOLOCHINE, P. DEGUENT, C. SERRES and G. DAVID (1977):

Light scattering determination of various characteristic parameters of spermatozoa motility in series of human sperm. Andrologia 9 (1), 36-48.

KAMIDONO, S., M. HAZAMA, O. MATSUMOTO, K. TAKADA, O. TOMIOKA and J. ISHIGAMI (1983):

Study on human spermatozoal motility: preliminary report on newly developed multiple exposure photography method.

Andrologia 15 (2), 111-119.

KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1981):

Sperm motility assessment by videomicrography.

Fert.Steril. 35, 188-193.

LEIDL, W., P. RIEMKE und I. SCHRÖPPEL (1987):

Computergesteuerte Videomikrographie-Auswertung zur Bestimmung der Spermienmotilität am Modell des Bullen.

Dtsch.tierärztl.Wschr. 94, 461-464.

LEIPNITZ, CH. (1965):

Routinebesamung mit Tiefgefriersperma, das in Pillenform gefroren wurde.

Dtsch.tierärztl.Wschr. 72, 469-470.

LEVIN, R.M., S.H. GREENBERG and A.J. WEIN (1981):
Clinical use of the turbidimetric analysis of sperm motility -
comparison with visual techniques.
Fert.Steril. 35, 332-336.

LINFORD, E. and F.A. GLOVER (1976):
The relationship between semen evaluation methods and
fertility in the bull.
J.Reprod.Fert. 47, 283-291.

MAKLER, A. (1978):
The thickness of microscopically examined seminal sample and
its relationship to sperm motility estimation.
Int.J.Androl. 1, 213-219.

MAKLER, A. (1980a):
Use of the elaborated multiple exposure photography (MEP) in
routine sperm analysis and for research purposes.
Fert.Steril. 33, 160-166.

MAKLER, A. (1980b):
The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and
motility evaluation.
Fert.Steril. 33, 337-338.

MÜLLER, E. (1968):
Fotogrammetrische Untersuchungen über die Motilität verdünnter
Rinderejakulate.
Wien.tierärztl.Mschr. 5/6, 309-324.

MÜLLER, E. (1976):
Vergleichende Untersuchungen über die Motilität und die
Gesamthydrogenaseaktivität von Frischsamen und aufgetautem
TGN-Sperma.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 83, 391-430.

NAGASE, H. and E.F. GRAHAM (1964):
Pelleted semen: Comparison of different extenders and
processes on fertility of bovine spermatozoa
V.Congr.Reprod.Anim.Artif., Trento, Vol.IV, 387

NORUSIS, M.J. (1986):
SPSS/PC+ for the IBM PC/XT/AT
SPSS Inc., Chicago.

RIEMKE, P. (1983):
Untersuchungen zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung von
Bullenspermien mit Hilfe der Videomikrographie.
Vet.med.Diss., München.

RIEMKE, P. und W. LEIDL (1985):
Motilitätsbeurteilung der Spermien mit Videomikrographie und
Computerauswertung.
Zuchthyg. 20, 106-107.

ROTHSCHILD, Lord (1953):

A new method of measuring sperm speeds.
Nature 171, 512-513.

SAACKE, R.G. and J.M. WHITE (1972):

Semen quality tests and their relationship to fertility.
Proc. 2nd NAAB Tech.Conf.Artif.Insem. and Reprod., 22-27,
Chicago.

SCHUBÖ, W. und H.-M. UEHLINGER (1986):

SPSS-X Handbuch der Programmversion 2.2.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

SCHUH, H. (1988):

Untersuchungen zur Maximierung der Samenausbeute
erwertgeprüfter Bullen in der künstlichen Besamung.
Vet.med.Diss., München.

TIMOURIAN, H. and G. WATCHMAKER (1970):

Determination of spermatozoan motility.
Dev.Biol. 21, 62-72.

VAN DUIJN, C., C. VAN VOORST and M. FREUND (1971):

Movement characteristics of human spermatozoa analysed from
kinemicrographs.
Europ.J.Obstet.Gyn. 4, 121-135.

WALL, K.A. and M.A. BOONE (1973):

Objective measurement of sperm motility.
Poultry Sci. 52, 657-660.

WALL, R.J., D.R. HAGEN and R.H. FOOTE (1980):

Measurement of bull sperm motility and velocity.
In: Testicular development, structure and function, 455-460,
Eds.: STEINBERGER, A. and E. STEINBERGER, Raven Press,
New York.

WALKER, J.S., H. WINET and M. FREUND (1982):

A comparison of subjective and objective sperm motility
evaluation.
J.Androl. 3, 184-192.

ZIEGLER, M. (1984):

Beziehungen zwischen Sperma- und Fruchtbarkeitsmerkmalen bei
Besamungsbullen an der Besamungsstation Meggle, Reitmehring-
Rottmoos.
Vet.med.Diss., München.

LEBENS LAUF

Name:	Gabriele Stumpe
Geburtsdatum:	12. Januar 1954
Geburtsort:	Wuppertal
Eltern:	Otto Stumpe, Fleischermeister Ingrid Stumpe, geb. Thelen
1960 - 1964	Volksschule Rudolfstraße, Wuppertal
1964 - 1972	Mädchengymnasium St. Anna, Wuppertal
1972 - 1975	Ausbildung zur pharm. techn. Assistentin
1975 - 1977	Arbeit als PTA (Widder-Apotheke, Wuppertal)
1977 - 1983	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1. Aug. 1983	Approbation als Tierärztin
1984 - 1986	Ass.-Tierärztin in der Praxis Dr. Schraishuhn, Mühlacker
1986 - 1988	Anfertigung der Dissertation an der Gynäkolo- gischen und Ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximi- lians-Universität, München

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. W. Leidl danke ich für die Überlassung des Themas und die gewährte Hilfestellung.

Den Mitarbeitern des Hauses sowie Herrn Professor Dr. Dr. K. Osterkorn und seinen Mitarbeitern gilt mein Dank für die Unterstützung, die mir bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit zuteil wurde.

Besonderers zu bedanken habe ich mich bei den Leitern der Besamungsstationen und ihren Mitarbeitern. Mit ihrer Bereitschaft zur Kooperation haben sie einen wesentlichen Beitrag zu der Untersuchung geleistet.

Für die finanzielle Unterstützung des Vorhabens sei der Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern gedankt.

